

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Gildas BEAUCHESNE

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES SUBSTANCES DE CROISSANCE
DU MAÏS IMMATURE. - Séparation de ces substances en trois groupes, et isolement d'une
« purine active » à partir de l'un de ces groupes.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 27 juin 1961, devant la Commission d'examen.

MM. CHOUARD.....	<i>Président.</i>
ULRICH.....	} <i>Examineurs.</i>
MOYSE.....	

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

—
1961

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Gildas BEAUCHESNE

-
- 1^{re} THÈSE.** — RECHERCHES SUR LES SUBSTANCES DE CROISSANCE
DU MAÏS IMMATURE. - Séparation de ces substances en trois groupes, et isolement d'une
« purine active » à partir de l'un de ces groupes.
- 2^e THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 27 juin 1961, devant la Commission d'examen.

MM. CHOUARD..... *Président.*
ULRICH..... } *Examineurs.*
MOYSE..... }

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1961



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. J. PÉRÈS

Professeurs :

G. JULIA	T	Anal. sup. et alg. sup.	FORTET	T	Calcul des probabilités.
DE BROGLIE...	T	Théories physiques.	SCHWARTZ ...	T	Calcul. diff. et intégral.
PRENANT	T	Anat. et histol. comparées.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
PÉRÈS	T	Mécan. des fl. et applic.	MALAVARD ...	T	Aviation (Tech. aéronaut.)
BOURCART ...	T	Géog. phys. et géol. dyn.	BRELOT	T	Calcul différentiel.
PLANTEFOL...	T	Botanique.	NORMANT	T	Synthèse organique gén.
GRASSÉ.	T	Evol. des êtres organisés.	BENARD	T	Chimie (E.N.S.C.P.).
PRÉVOST	T	Chimie organique.	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
BOULIGAND ..	T	Anal. appl. à la géométrie.	DUGUÉ	T	Statist. mathématiques.
CHAUDRON ...	T	Chimie appliquée.	SOULAIRAC ...	T	Psychophysiologie.
WYART	T	Minéralogie et cristallogr.	ULRICH	T	Physiol. végét. (E.N.S.).
TEISSIER	T	Zoologie.	MARÉCHAL...	T	Optique théor. et appl.
MANGENOT...	T	Biologie vég. (Orsay).	KIRRMANN ...	T	Théories chimiques.
AUGER	T	Phys. quant. et relativité.	CHADEFAUD ..	T	Botanique.
MONNIER	T	Physiol. des fonctions.	M ^{lle} LE BRETON	T	Physiologie.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	SALEM	T	Mathémat. générales.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	LELONG	T	Mathémat. générales.
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	DEVILLERS ...	T	Anatom. et histol. comp.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	EHRESMANN ...	T	Topologie algébrique.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	FRANÇON.....	T	Physique (S.P.C.N.).
COULOMB	T	Physique du Globe.	GLANGEAUD ...	T	Géogr. phys. et géol. dyn.
M ^{lle} COUSIN ...	T	Biologie.	GODEMENT ...	T	Mathématiques (M.P.C.).
CHRÉTIEN ...	T	Chimie minérale.	PISOT	T	Calcul des probabilités.
DRACH	T	Zoologie.	ROCH	T	Géologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).	SCHATZMAD ...	T	Astrophysique.
EPHROSSI ...	T	Génétique.	TERMIER.....	T	Paléontol. stratigraph.
RIVIÈRE	T	Géologie (Orsay).	ZAMANSKY....	T	Mathémat. générales.
GAUTHERET...	T	Biologie (P.C.B.).	LENNUIER ...	T	Physique (P.C.B.).
R. LUCAS	T	Recherches physiques.	RIZET	T	Génétique (Orsay).
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire.	ROUTHIER ...	T	Géologie appliquée.
ARNULF	T	Optique appliquée.	M ^{me} TONNELAT	T	Relativité.
MORAND	T	Physique enseignement	DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOLEILLET ...	T	Physique (P.C.B.).	SOUCHAY	T	Chimie (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.	AIGRAIN	T	Electrotech. générale.
DANJON	T	Astronomie.	BRUSSET	T	Chimie minérale.
PETIT	T	Biologie maritime.	M. LÉVY	T	Physique théorique des
QUENEY	T	Météorol. et dyn. atmosph.			Hautes Energies (Orsay)
GALLIEN	T	Embryologie.	M ^{me} CHAIX ...	T	Chimie biologique.
EICHORN ...	T	Biologie végétale (P.C.B.).	M ^{me} HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.).
DE CUGNAC ...	T	Biologie végét. (S.P.C.N.).	PIAUX	T	Chimie (S.P.C.N.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie physique.	BRUN	T	Mécan. expér. des fluides.
THELLIER ...	T	Physique du globe.	LEDERER	T	Chimie biologique.
L'HERITIER...	T	Biolog. gén. (Orsay.)	M ^{me} DUBREIL	T	Mathémat. (Agrég.).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).	M ^{me} LELONG ...	T	Mathémat. (E.N.S.).
PONCIN	T	Mécanique générale.	GELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
DUBREIL	T	Arith. et théor. des nombr.	COTTE	T	Physique (M.P.C.N.).
QUELET	T	Chimie organique.	J. E. DUBOIS	T	Chimie (M.P.C.).
CAGNIARD...	T	Géophysique appliquée.	LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
CHAMPETIER.	T	Chimie macromoléculaire.	A. MICHEL ...	T	Chimie minérale (Orsay).
CUVILLIER ...	T	Micropaléontologie.	OLMER	T	Energétique générale.
JUNG	T	Pétrographie.	ROUAULT ...	T	Physique.
TRILLAT	T	Microscop. et diff. élect.	GAUTHIER ...	T	Mécanique appliquée.
WIEMANN ...	T	Chimie organ. et struct.	BARCHEWITZ.	T	Chimie physique.
JACQUINOT ..	T	Spectroscopie (Orsay).	BROSSEL ...	T	Physique atomique.
VASSY	T	Phys. de l'atmosphère.	BUSER	T	Biologie animale (P.C.B.).
DESTOUCHES	T	Théories physiques.	CAMUS	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PRUVOST	T	Géologie.	CASTAING....	T	Physique (Orsay).
AMIEL	T	Chimie des solides.	CURIEN	T	Minéral. et cristall.
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.	MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).
J.-P. MATHIEU	T	Recherches physiques.	PANNETIER ...	T	Chimie (Orsay).
COUTEAUX ...	T	Biol. animale (P.C.B.).	POSSOMPES ..	T	Biol. animale (P.C.B.).
MAY	T	Zoologie (Orsay).	PULLMANN ...	T	Chimie théorique.
CHOQUET	T	Théor. des fonct. et topol.	TEILLAC	T	Phys. nucl. et rad. (Orsay)
FELDMANN ...	T	Biologie végét. (P.C.B.).	TONNELAT ...		Biologie physico chim.
GUINIER	T	Phys. des solides (Orsay)	VILLE	T	Econométrie.
JOST	T	Physiologie comparée.	WILLEMART...		Chimie (P.C.B.).

DODE	T	Chimie (Orsay).	BERTEIN	Electronique (Orsay).
FREYMAN	T	Physique (S.P.C.N.).	BOUSSIÈRES	Chim. des radioélé. (Ors.)
GUINOCHET	T	Biologie vég. (Orsay).	M ^{me} COUTURE	Therm. et mécan. phys.
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).	ELLENBERGER	Géologie appliquée.
Mlle JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.).	FRANC	Biol. animale (P.C.B.).
CHEVALLEY	T	Géom. alg. et théor. d. gr.	SCHNELL	Botan. tropicale (Orsay).
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).	STOLKOWSKI	Biol. animale (P.C.B.).
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).	ACHER	Chimie biol. (Orsay).
DELANCE	T	Mathémat. (Orsay).	BAUDOUIN	Biologie.
DENY	T	Mathémat. gén. (Orsay).	BEAUMONT	Biologie animale.
GERMAIN	T	Mécan. théor. des fluides.	BLAMONT	Géophysique ionosphère.
G. LUCAS	T	Géologie.	BOURREAU	Biol. vég. (S.P.C.N (Orsay)
ALLARD	T	Chimie physique.	D. CURIE	Physique (M.G.P.).
BERTHELOT	T	Phys. fondam. des htes énergies (Orsay).	DURAND-DELGA	Géologie.
BRICARD	T	Météorologie.	FRÉON	Chimie organ. (Orsay).
M ^{me} ALBE- FESSARD		Psychophysiologie.	HELLER	Physiologie végétale.
FRIEDEL		Phys. des solides (Orsay).	TORTRAT	Calcul des probabilités.
M. JULIA		Chimie organ. structurale.	CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.).
LENDER		Biol. animale (SPCN) (Ors.)	MAGNAN	T Physique (P.C.B.).
MAGAT		Phys.-chimie des rayonn.	DAUDEL	Mécan. ondul. appliquée à la chim. théor. et à la phys. nucléaire.
M ^{lle} QUINTIN	T	Electrochimie.	M ^{me} FOURCROY	Biol. végét. (S.P.C.N.).
MONOD	T	Biochimie cellulaire.	BARRAUD	Physiologie cellulaire.
BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay).	NOIROT	Evol. des êtres organisés.
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	M ^{me} FOURÈS- BRUHAT	T Mécan. anal. et mécan. cél.
CHARLOT	T	Chimie analytique.	M ^{lle} VEIL	Physiologie générale.
HAISSINSKY	T	Radiochimie.	LWOFF	T Microbiologie.
LEMÉE	T	Physiol. B.M.P.V. (Orsay)	SIESTRUNCK	T Mécan. phys. et expérim.
GUÉRIN	T	Chimie (Orsay).	LACOMBE	T Métallurgie (Orsay).
M. CHATELET		Chimie (P.C.B.).	BROCHARD	T Physique P.C.B. (Orsay).
JEAN		Physique (Orsay).	CABANNES	T Mécanique générale.
MATTIER	T	Physique (Orsay).	LESIEUR	T Mécan. M.P.C. (Orsay).
Louis MICHEL		Phys. théorique (Orsay).	MAZET	T Mécanique générale (Orsay)
RUMPF		Chimie (P.C.B.).		
BERGERARD		Biol. anim. (SPCN) (Ors.).		

Secrétaire général R. POUILLAIN

A ma Mère,

que je veux entourer en cette dédicace des chercheurs et techniciens inconnus qui, dans les laboratoires, par les services petits et grands qu'ils rendent, facilitent le travail de ceux dont on parle, eux dont jamais ni les noms ni les travaux ne paraîtront au grand jour, et sans qui, bien souvent, aucune recherche de valeur n'aurait pu aboutir.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

RECHERCHES SUR LES SUBSTANCES DE CROISSANCE DU MAIS IMMATURE

par M. Gildas BEAUCHESNE

Je remercie M. le Professeur COMBES, membre de l'Institut, Professeur honoraire à la Sorbonne, qui a bien voulu s'intéresser à ces travaux et m'encourager de sa bienveillance.

Au Professeur CHOUARD, Professeur à la Sorbonne, Directeur du Phytotron de Gif-sur-Yvette, qui m'accueillit si largement dans son service de la Sorbonne d'abord, et, plus tard, au Phytotron de Gif-sur-Yvette, où ces travaux ont pu se poursuivre dans les meilleures conditions, je dois un très spécial merci.

Ses connaissances extrêmement vastes, l'intérêt qu'il sait faire naître à partir d'observations que des vues moins larges pourraient négliger, l'enthousiasme qui l'anime et qu'il communique aux autres en font un maître inoubliable, dont la très grande bonté et j'oserais dire l'amitié, m'a soutenu en des périodes qui ne furent pas toujours faciles.

Je le remercie également d'avoir bien voulu me faire l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Que M. le Professeur ULRICH, Directeur de l'Ecole Normale Supérieure de Saint-Cloud, Directeur de la Station du Froid de Bellevue, Professeur à la Sorbonne, soit très spécialement remercié d'avoir accepté d'être de ce Jury. Depuis mon arrivée à la Sorbonne, il a bien voulu s'intéresser à ces travaux, et m'encourager de ses conseils et de son amitié.

Je remercie M. le Professeur MOYSE, Directeur du laboratoire de Photosynthèse à Gif-sur-Yvette, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris-Orsay, d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je le remercie des critiques qu'il m'a faites aussi bien que de ses exigences. J'ai été extrêmement touché qu'il veuille bien lire et revoir ma thèse dans le détail et en être le rapporteur dans ce Jury.

La part de reconnaissance que je donne au Professeur NETIEN de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Lyon est très grande ; c'est lui qui m'a donné le sujet de ce travail alors qu'à Lyon je fréquentais le laboratoire de Botanique de la Faculté de Pharmacie.

Rarement maître a été si désintéressé : saisissant l'intérêt de ces recherches commencées avec lui, il m'a cependant laissé partir et poursuivre ce travail en dehors de son laboratoire, à un moment où des obligations m'appelaient à Paris.

Il n'a pas cessé de s'intéresser à ces recherches, prêt à faire refaire à ma demande certaines expérimentations dans son laboratoire pour me faciliter la tâche. L'amitié qu'il veut bien me témoigner m'est très précieuse. Qu'il soit remercié, et avec lui tous ceux qui en cette période lyonnaise de ma recherche m'ont aidé et entouré de leur amitié, particulièrement Mme S. WALTER-DELA TOUR, assistants, collaborateurs, techniciens et garçons de laboratoire.

M. le Professeur MENTZER, Chef du département de Biochimie au Muséum, m'a conseillé tout au début de cette recherche et c'est grâce à lui que j'ai connu le Professeur NETIEN à Lyon ; qu'il en soit remercié.

Je remercie M. NITSCH, Sous-Directeur au Phytotron, et Mme NITSCH, qui ont bien voulu m'apprendre et permis d'utiliser au cours de ce travail le test mésocotyle qu'ils ont mis au point.

Je veux aussi remercier M. LIORET, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Paris-Orsay, pour les conseils qu'il a bien voulu me donner si cordialement.

Je ne saurai dire tout ce que je dois à mes compagnons de laboratoire de la Sorbonne et de Gif-sur-Yvette. Je les remercie du soutien que leur amitié m'a apporté au cours de ces années de recherches. Je veux spécialement citer Mme D. AGHION-PRAT, pour l'aide si précieuse et intelligente qu'elle m'a donnée au cours de ces derniers mois. Je veux unir à ces remerciements les secrétaires, les techniciens, les jardiniers et les femmes de ménage qui m'ont allégé de bien des soucis.

Je remercie enfin MM. le Directeur et Administrateurs du Centre National de la Recherche Scientifique pour l'aide matérielle qui m'a permis d'effectuer ce travail.

INTRODUCTION

Le but de ce travail est d'étudier le contenu de l'extrait laiteux du caryopse de Maïs immature, considéré en tant que facteur complexe de croissance.

Les investigations que cette entreprise nécessite reposent sur la culture « *in vitro* » des tissus végétaux. Cette technique met, à la disposition de la recherche, un moyen d'investigation éprouvé pour explorer le domaine complexe des substances de croissance (GAUTHERET, 1959).

Il existe d'autres types d'essais biologiques, comme le test Avoine de WENT et tous ceux qui en dérivent. Il a été parfois nécessaire d'y recourir. Mais il ne semble pas qu'ils puissent fournir autant de données et de sécurité dans le domaine d'exploration envisagé que la culture « *in vitro* » de tissus ou d'organes végétaux, car ce sont seulement des tests de croissance par élongation, alors que les cultures de tissus végétaux donnent des réponses de grandissement cellulaire (auxésis) et de division cellulaire (mérésis).

L'inventaire des travaux effectués pour déceler, isoler et caractériser les substances de croissance présentes dans les extraits naturels, montre que la culture des tissus végétaux est souvent à la base de ces recherches depuis la mise au point de cette technique.

Il fut une époque où la culture de tissus ou d'organes végétaux paraissait impossible ; toutes les tentatives échouaient. Cependant, ROBBINS en 1922, cultivant des méristèmes radiculaires en ajoutant un autolysat de levure au milieu de culture, obtient, pour la première fois, la multiplication des cellules de ces méristèmes.

S'inspirant de cette technique WHITE, à l'aide d'un milieu contenant également un autolysat de levure, réalise la culture indéfinie de racines de tomates (1934).

Les difficultés contre lesquelles s'étaient brisées toutes les tentatives précédentes s'atténuèrent du même coup. En 1939, la technique de culture indéfinie « *in vitro* » de tissus ou d'organes végétaux était définitivement mise au point par WHITE, par GAUTHERET, par NOBECOURT. Elle pouvait désormais servir d'instrument à l'étude des substances de croissance.

Le présent travail sur les substances de croissance contenues dans l'albumen laiteux de caryopse de Maïs immature, que l'on appellera ici en abrégé lait de Maïs, prend ainsi sa place parmi de nombreux autres travaux similaires.

Il est aisé de mettre en évidence la stimulation de croissance due au lait de Maïs. Mais il est beaucoup plus difficile de déterminer les substances responsables de l'activité de cet extrait brut.

Avant tout, il fallait résoudre les trois questions suivantes :

1^o La stimulation de croissance provoquée par le lait de Maïs est-elle due aux seules auxines dont le type est l'acide indole acétique ?

2^o Quel rôle attribuer aux acides aminés certainement présents dans ce lait embryonnaire ?

3^o Peut-elle être la résultante de l'action de plusieurs substances ?

— I —

La réponse à ces trois questions constitue la première étape de cette recherche. Il importe de choisir les tissus végétaux qui serviront à éprouver l'activité du lait de Maïs. Ce choix n'est pas fait, *a priori*, avant même que la recherche n'ait été engagée. Il est le fruit de l'évolution de la recherche elle-même. Au tissu de Carotte, utilisé dès le début, fut adjoint très tôt le tissu de tubercule de Topinambour. Ce n'est que beaucoup plus tard que le tissu de moelle de Tabac sera introduit comme essai biologique. Topinambour et Tabac ont été choisis à cause de la relative spécificité de leur réponse aux substances de croissance. Les résultats obtenus avec ces différents tissus cultivés sur un milieu contenant du lait de Maïs sont comparés à ceux que donnent les mêmes tissus cultivés seulement en présence d'acide indolacétique (AIA).

Ainsi quelques indices préliminaires sur les substances de croissance du lait de Maïs sont recueillis.

Le lait de Maïs est ensuite soumis à différentes tentatives de fractionnement par des procédés physiques ou chimiques.

Par là sont acquises des précisions qui permettent de faire un choix entre des techniques possibles, soit pour le fractionnement du lait de Maïs, soit pour la préparation des milieux de culture.

— II —

Dans une seconde partie est mise au point une technique utilisant les échangeurs d'ions pour la séparation des divers constituants du lait de Maïs.

Ces constituants se trouvent répartis par ce procédé en trois groupes chimiquement différents, actifs sur la croissance des tissus végétaux.

L'analyse des constituants de chaque groupe reste à faire.

Deux de ces groupes retiennent particulièrement l'attention. La stimulation de croissance qu'ils manifestent ne peut être due à des auxines acides ni à des esters de ces corps à l'état libre.

Toutefois, il se montre nécessaire d'apporter une modification et de faire une mise au point de la technique initiale de fractionnement sur échangeurs d'ions.

Il fallait empêcher certains changements dans les propriétés physiques du milieu d'échange, qui pouvaient être dommageables pour les substances actives du lait de Maïs.

En conclusion de cette seconde partie, il est donné un aperçu des techniques de fractionnement utilisées par d'autres chercheurs dans le domaine des laits embryonnaires.

— III —

La troisième partie expose l'étude des fractions neutre et basique.

L'analyse du groupe « neutre » est faite sommairement. La dialyse et la chromatographie suivie d'un test d'élongation, forment l'essentiel des techniques utilisées dans ce cas. Il faut noter également un essai de fractionnement sur échangeurs basiques forts.

Le groupe basique est au contraire l'objet de tout l'effort de recherche. Une substance quasiment pure en est isolée, mais en quantité trop faible encore pour que l'analyse chimique en puisse être faite.

L'électrophorèse sous ses diverses formes et les échangeurs basiques forts ont permis d'atteindre ce résultat.

Un seul tissu végétal a été utilisé dans cette dernière étape : le tissu de moelle de Tabac.

Les réactions physiologiques de ce tissu vis-à-vis des substances de croissance sont relativement spécifiques. Grâce à cela il a été possible de discerner à quelle catégorie de corps la substance isolée devait appartenir.

D'autre part, les réactions colorées et l'analyse spectro-photométrique dans l'ultra-violet sont en accord avec ce qui peut être déduit des réactions physiologiques de la moelle de Tabac.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Il n'est pas question ici de faire un historique englobant tous les travaux sur les substances de croissance, en particulier ce qui pourrait être appelé « l'auxinologie » et tout ce qui concerne les gibbérellines ne pouvant pas prendre place ici. (Voir sur ce sujet THIMANN et CHOUARD, 1956, et GALSTON et PURVES, 1960).

Les recherches qui vont être exposées portent uniquement sur un lait embryonnaire végétal (réserves de graines immatures). Seuls, les travaux similaires seront cités. Par extension seront incluses quelques recherches sur des extraits végétaux non embryonnaires essayés sur les cultures de tissus.

1. *Extraits de graines.*

Les premiers à user d'un extrait végétal n'ayant subi aucune transformation enzymatique ou chimique sont VAN OVERBEEK, CONKLIN et BLAKESLEE (1941). En ajoutant du lait de Coco au milieu de culture ils obtiennent « *in vitro* » le développement d'embryons immatures de *Datura*.

A leur suite, CAPLIN et STEWARD (1948) utilisent le même extrait. Ils l'introduisent dans un milieu de culture pour tissus normaux de Carotte. Ils constatent que les tissus prolifèrent beaucoup plus sur lait de Coco que sur le milieu témoin. A partir de cela, ces auteurs vont entreprendre l'étude systématique du lait de Coco et l'analyse de ses constituants. Ils décrivent l'interaction du 2,4-D et du lait de Coco sur les tissus de Pomme de terre (STEWARD et CAPLIN, 1951). Ils étudient également le comportement d'explantats de phloème de Carotte cultivés selon une technique spéciale (1954) qu'ils conserveront dans la suite de leurs recherches sur le lait de Coco (STEWARD et CAPLIN, 1954, et STEWARD et SHANTZ, 1954).

Dès 1949, dans le laboratoire du Professeur GAUTHERET, DUHAMET étudie les réactions de différents tissus en présence

de lait de Coco : tissus normaux de Topinambour (1949), Crown-gall de Scorsonère (1950 a), Crown-gall de Vigne, de Tabac, de Topinambour et de Scorsonère (1951 a), tissus normaux de *Parthenocissus triscupidata* (1950 b), et tissus accoutumés aux hétéro-auxines de Scorsonère, de Tabac et de Vigne (1951 b). DUHAMET compare également l'action du lait de Coco sur les tissus de Carotte provenant d'une racine et les tissus provenant d'une souche de culture de tissus (1951 c). Enfin il observe la diversité de comportement de quelques tissus végétaux cultivés en présence de lait de Coco, d'auxine ou de mélanges de ces substances (1957).

LIORET (1952) étudie l'action du lait de Coco sur les échanges gazeux respiratoires de tissu de Crown-gall de Scorsonère (*Scorzonera hispanica* L.) cultivé « *in vitro* ». Il étend son étude aux variations du métabolisme des tissus de Crown-gall de Scorsonère et aux tissus du xylème de tubercule de Scorsonère (1960) en présence du lait de Coco.

Une des réalisations qui est due encore aux possibilités de cet extrait est la culture de tissus de Monocotylédones (MOREL et WETMORE, 1951).

Il ressort, de travaux aussi divers, que le lait de Coco apporte aux tissus végétaux des potentialités de développement qu'aucune combinaison de substances ne peut remplacer. Les extraits embryonnaires végétaux prennent dès lors une place considérable dans le domaine des substances de croissance naturelles. Les autolysats de levures de ROBBINS et WHITE passent au second plan.

Le lait de Maïs attire l'attention des chercheurs en même temps que le lait de Coco, bien qu'il en soit moins question au début. CAPLIN et STEWARD (1948) l'essaient sur des cultures d'embryons et d'explantats de Carotte.

Ils entreprennent alors l'étude systématique de laits embryonnaires de Graminées (Orge, Blé, Avoine et Seigle) et de Dicotylédones (Noix et Marrons d'Inde) (STEWARD et CAPLIN, 1952, et STEWARD et SHANTZ, 1955). Tous ces extraits à des degrés divers favorisent le développement des explantats de Carotte.

GYORFFY, REDEI et REDEI (1955), confirment les résultats obtenus par STEWARD et ses collaborateurs avec le lait de Maïs sur la culture de tissus normaux de Carotte. A la suite de ces différents travaux, KOVOOR entreprend une enquête sur l'activité physiologique et histogène de diverses substances d'origine végétale. L'auteur, pour ses essais biologiques, s'adresse surtout aux tissus de tubercule de Topinambour et aux tissus de Crown-gall de Scorsonère, plus rarement aux tissus d'une souche normale de Carotte. Il use aussi d'un test Radis pour la division cellulaire

(BESSET, 1954). Les extraits de *Borassus flabellifer*, d'*Elaeis guineensis*, de *Passiflora edulis*, et d'autres extraits semblables, exercent aussi sur les cultures de tissus une action identique ou simplement analogue à celle du lait de Coco (voir aussi NITSCH, 1954).

2. Extraits de fruits.

Il n'est question jusqu'ici que de réserves de graines et non de fruits au sens strict. Des extraits de fruits aux activités diverses font également l'objet de nombreux travaux. NITSCH (1951 et 1960 a, 1960 b) décrit l'action du jus de Tomate sur différents tissus normaux et tumoraux. Les conclusions de DEMETRIADES et NITSCH (1953), et DEMETRIADES (1954) ne concordent pas avec celles de KOVOOR (1954) à propos de l'action du jus de Tomate sur les tissus de Crown-gall de Scorsonère. KOVOOR étudie aussi le jus de Raisin (1953), d'*Annona* et d'*Artocarpus* (1954). Ces extraits ne sont actifs que sur les tissus de Crown-gall de Scorsonère. L'auteur pense que les facteurs de croissance qu'ils contiennent diffèrent de ceux du lait de Coco et du jus d'Orange (1954).

3. Extraits de tissus.

Dans un exposé qui se veut limité aux seuls travaux sur les extraits de graines et de fruits, y a-t-il place pour des recherches aussi différentes que celles qui ont pour objet l'activité de croissance d'extraits de tissus végétaux ? L'étude des substances de croissance de graines ou de fruits trouve son prolongement nécessaire dans celle des extraits de tissus végétaux. Il n'est pas possible en effet d'avoir une idée du rôle des extraits embryonnaires ou autres sur la croissance des tissus, sans le secours de travaux comme ceux dont il va être très brièvement question.

Un tissu tumoral dont les cellules prolifèrent activement doit contenir des substances de croissance. Partant de ce principe, HILDEBRANDT, RIKER et DUGGAR écrasent les tissus de Crown-gall, et ils étudient l'effet de l'extrait obtenu sur le développement de tissus tumoraux de Soleil et de Tabac (1946). STEWARD, CAPLIN et SHANTZ (1955) en se servant du phloème de Carotte comme matériel biologique reprennent ces travaux. Ils constatent que certains de leurs extraits sont plus actifs que le lait de Coco. Des extraits analogues, mais étudiés strictement du point de vue auxinique, sans le recours aux cultures de tissus ont été faits également. (Voir G. PAVILLARD, 1953).

Les tissus jeunes sont aussi le siège de divisions cellulaires intenses. Il était logique d'imaginer que leurs extraits devaient être actifs. STEWARD et ses collaborateurs mettent en évidence en

effet, que les extraits de tiges et de feuilles de *Bryophyllum* et de *Kalanchoe* favorisent le développement du phloème de Carotte. Ces auteurs pensent que les substances extraites sont analogues à celles du lait de Coco (1955).

JABLONSKI et SKOOG avaient déjà montré qu'un tissu en voie de division active (xylème de Tabac) mis en présence d'un tissu incapable de proliférer par lui-même (moelle de Tabac) induit, chez ce dernier, la division cellulaire (1954). Une substance stimulatrice de division diffuse dans la gélose du milieu de culture. SKOOG et ses collaborateurs poursuivent des recherches dans ce domaine : ils ont purifié des extraits de Pois et des extraits de feuilles d'espèces diverses (communication personnelle). KOVOOR étudie l'action d'extraits de tissus de deux espèces de *Parthenocissus* (*P. tricuspidata* et *P. quinquefolia*) (1960). Enfin, J.P. NITSCH et C. NITSCH isolent du Topinambour « Piedalu 17 » un régulateur de croissance (1960 c).

Extraits de graines, extraits de fruits et extraits de tissus végétaux sont l'objet de nombreuses études et recherches. Cet historique ne prétend pas être exhaustif. Il se propose seulement de donner un aperçu de l'évolution des travaux sur les substances de croissance autres que les auxines et les gibbérellines.

Aucune de ces recherches n'a encore abouti à la caractérisation d'une substance active autre que l'auxine. Il n'est pas certain que la diphenylurée isolée du lait de Coco par SHANTZ et STEWARD soit réellement présente à l'état naturel dans l'extrait étudié.

Actuellement, toutes les substances isolées ou groupes de substances favorisant la division cellulaire semblent devoir se rattacher aux purines.

Les techniques de séparation utilisées par quelques-uns des auteurs cités seront exposées brièvement (II^e partie, chap. IV).

Une expérience faite à Lyon avec le Professeur NETIEN (1951) est à l'origine des recherches dont ce mémoire fait l'objet.

Dans le milieu de Knop dilué au demi est introduit un broyat de graines de Maïs non mûres. Sur le milieu contenant le lait de Maïs, il se produit une prolifération des tissus très forte par rapport aux témoins.

Dans cette expérience, le tissu utilisé provenait d'une souche normale de Carotte conservée par GAUTHERET.

Sur le milieu contenant 0,1 mg/litre d'AIA (1), le poids de tissu frais en fin d'expérience atteignait 4960 mg, et sur le milieu contenant 10% de lait de Maïs, il atteignait 11 835 mg.

(1) AIA = acide indole acétique.

CHAPITRE II

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1. *Choix du matériel.*

Trois sortes de tissus végétaux ont été utilisés pour l'épreuve biologique des substances de croissance du lait de Maïs au cours de ces recherches.

1^o Tissus de Carotte provenant de la souche normale conservée par GAUTHERET depuis 1937.

2^o Tissus de tubercule de Topinambour de trois variétés différentes :

a. La variété « Rouge fuseau » cultivée au jardin botanique de la Faculté de Pharmacie de Lyon.

b. Une variété dite « Rouge de Gouvieux » provenant de Gouvieux, dans l'Oise.

c. La variété « Piedalu 17 » des Etablissements Vilmorin, étudiée par J.P. NITSCH.

Seules les deux premières variétés réagissent d'une manière identique entre elles.

3^o Tissus de moelle de Tabac (*N. Tabacum* « Wisconsin 38 »).

Pour les cultures des trois tissus envisagés, le milieu de base est le même, à de très rares exceptions près. Ce milieu est constitué par la solution minérale de Knop diluée au 1/2 et par des oligo-éléments de BERTHELOT (GAUTHERET 1942), avec 1% de gélose.

Pour les tissus de Carotte, il faut ajouter au milieu de base 4% de saccharose, 10 ppm de chlorhydrate de cystéine, 1 ppm d'aneurine, 0,1 ppm d'AIA (1).

Pour les tissus de tubercules de Topinambour, le saccharose est remplacé par 5% de glucose. Le chlorhydrate de cystéine et l'aneurine sont supprimés. La dose d'AIA, à part quelques exceptions, est de 0,5 ppm, ou de 0,1 ppm suivant les variétés.

Pour les tissus de la moelle de Tabac, au milieu de base il est conseillé d'ajouter 0,5 ppm d'acide nicotinique, 0,1 ppm de pyridoxine et 1 ppm d'aneurine. La suppression de ces corps ne semble pas cependant gêner beaucoup le développement des tissus. La dose d'AIA est portée à 2 ppm, dose optimale pour le Tabac d'après SKOOG (1954). Le sucre utilisé est le glucose à 3%.

(1) Par souci d'unification, il a semblé convenable de remplacer les indications classiques : 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , par les notations en ppm (partie par million), correspondantes. Cette notation est de plus en plus utilisée dans les publications et prête moins à confusion.

Exceptionnellement, un milieu de culture étudié par SKOOG pour les cultures de Tabac a été essayé. Bien que l'action de l'auxine se manifeste plus intensément sur ce milieu, le milieu de Knop lui a été préféré finalement, car les tissus de Tabac qui s'y développent sont d'apparence plus saine.

2. Stérilisation du matériel végétal.

Une solution d'hypochlorite de calcium à 7% est employée pour stériliser les tubercules de Topinambour et les tiges de Tabac. Pour faciliter l'action du désinfectant, les tiges de Tabac dépouillées de leurs feuilles sont frottées avec un tampon de coton imbibé de détergent, avant d'être plongées dans la solution d'hypochlorite. Après 15 minutes environ, l'hypochlorite est jeté et les tiges sont frottées avec un coton imbibé d'alcool à 98%, et transportées dans la pièce à ensemencement aseptique, entre deux feuilles de papier filtre humectées d'alcool à 98%.

Le traitement, à l'hypochlorite peut être remplacé par le « Mercryl Laurylé » chirurgical. Les tiges sont badigeonnées avec un tampon de coton imbibé d'alcool avant d'être transportées dans la pièce à ensemencement. Ces différents traitements suffisent dans le cas où il s'agit de prélever la moelle de la tige. Pour les cultures de segments de tiges, il faut prendre d'autres précautions, de rinçages stériles en particulier.

3. Prélèvement des tissus.

Tissus de Carotte. — Les tissus de Carotte sont découpés dans des boîtes de Pétri stériles. Les explantats sont ensuite répartis dans des vases à peser stériles pour la pesée de l'ensemble de chaque série de culture.

Tissus de Topinambour. — La même technique est utilisée pour les tissus de Topinambour. Mais les pesées d'explantats sont faites morceau par morceau. Plus tard, le découpage classique au scalpel est remplacé par le prélèvement au trocart, les cylindres de 6 mm de diamètre, obtenus de cette manière, sont débités en morceaux de 5 mm de long. Les morceaux sont très homogènes, le poids moyen des explantats est de 150 mg.

Tissus de moelle de Tabac. — Des Tabacs élevés en serre en jours continus sont découpés lorsqu'ils atteignent 1 m à 1 m 50 de long et de 15 à 20 mm de diamètre. Les 15 et 20 derniers centimètres vers le sommet sont éliminés, ainsi que les parties les plus ligneuses de la base et les nœuds : seuls sont conservés les entrenœuds. A l'aide d'un trocart, des cylindres de moelle de 4 mm de diamètre sont prélevés dans l'axe de ces entrenœuds.

Ces cylindres sont ensuite découpés en fragments de 5 mm de long. Le poids de ces explantats varie peu et se maintient entre 57 et 60 mg. (Voir l'étude statistique.) (1). Le tissu de moelle de Tabac est employé en tant que test de division cellulaire (JABLONSKI et SKOOG, 1954).

La préparation des explantats se fait de la manière suivante :

A l'aide d'un trocart de 4 mm de diamètre la moelle est prélevée au centre des entre-nœuds des tiges de Tabac. Les cylindres de moelle ainsi obtenus sont débités en segments réguliers de 5 mm à l'aide d'une série de lames de rasoir maintenues à 5 mm les unes des autres.

Les poids des fragments découpés de cette manière varient peu et sont toujours de l'ordre de ceux de l'exemple rapporté en note.

Sauf indication contraire, il n'a été utilisé que dix fragments

(1) POIDS DES MORCEAUX DE MOELLE DE TABAC
AU MOMENT DE LA MISE EN CULTURE
(CONTROLE STATISTIQUE)

20 morceaux pesant (en mg) : 55, 60, 62, 57, 57, 55, 62, 65, 64, 60, 58, 61, 57, 57, 60, 55, 56, 59, 57, 57.

$$\text{Moyenne } \bar{x} = 58,7$$

$$\text{Ecart type : } s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

$x - \bar{x}$ = écart individuel avec la moyenne.

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n} = \frac{116,20}{20} = 8,31$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}} = \sqrt{8,31} = 2,88$$

s de l'échantillon

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)} = \frac{166,20}{19} = 8,74$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} = \sqrt{8,74} = 2,95$$

Le coefficient de variation est :

$$v = \frac{100 \text{ } s \%}{\bar{x}} = \frac{295}{58,7} = 5,04 \%$$

Degré de précision de la moyenne (intervalle de confiance) :

$$sm = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n - 1)}} = \sqrt{\frac{166,20}{380}} = \sqrt{0,4373} = 0,66$$

$$\text{à } 99 \% = m \pm Tsm = 58,7 \pm 0,66 \times 2,861 = 58,7 \pm 1,88$$

$$\text{à } 95 \% = \pm Tsm = 58,7 \pm 0,66 \times 2,093 = 58,7 \pm 1,38$$

de tissus par expérience. Les différences surtout morphologiques et histologiques entre les tissus de moelle de Tabac cultivés sur le lait de Maïs ou ses fractions, et les tissus cultivés sur les milieux témoins, sont très importantes et les résultats sont hautement significatifs avec ce nombre de fragments. (HELLER, 1953 et GAUTHERET, 1959).

Il a paru suffisant d'exprimer la croissance des cultures en augmentation du poids de substance fraîche (P.F.) et parfois de substance sèche (P.S.) bien que ce ne soit là que deux aspects exprimant incomplètement le phénomène complexe de la croissance.

Des estimations d'acide désoxyribonucléique sont également utilisées pour avoir une indication de la croissance de la masse des noyaux provoquée par la substance isolée du groupe basique à un stade de purification poussée. Des dosages de ce genre ont été faits par SILBERGER (1953) et SILBERGER et SKOOG (1953) sur le même matériel avec les mêmes méthodes.

Enfin, avec la moelle de Tabac, il est quelquefois impossible d'introduire une comparaison pondérale — qui n'aurait pas de sens — les différences morphologiques entre les cultures sont trop considérables, et ces différences à elles seules sont significatives.

Préparation et conservation du lait de Maïs. — Le lait de Maïs provient d'un broyat de caryopses de Maïs immature. Les épis sont cueillis lorsque les grains sont laiteux (non pâteux). Avec un couteau inoxydable bien aiguisé, les épis sont râpés et les grains sont ensuite broyés dans un appareil à jus de fruit. Le lait de Maïs ainsi obtenu peut être conservé au froid à -20°C . Ce mode de stockage présente cependant bien des inconvénients. A cette température, des actions enzymatiques peuvent se poursuivre encore, et elles risquent de s'accroître lors de la décongélation des stocks au moment des prélèvements. (cf. BENSON, 1955 in Peach et Tracey. III. Phosphorylase active à -50°C .)

Ce mode de stockage a été abandonné au profit de la conservation dans l'alcool à 50% : au lait de maïs frais, un volume égal d'alcool à 98% est ajouté. Il se forme un précipité qui après centrifugation est repris par un volume d'alcool à 50% tel que le volume en fin d'opération soit le double du volume initial du lait de Maïs frais. Finalement, le précipité est centrifugé et jeté.

CHAPITRE III

ACTION DU LAIT DE MAÏS
SUR LES DIFFÉRENTS TISSUS VÉGÉTAUX UTILISÉS1. *Action sur les tissus de Carotte.*

Dans l'expérience à laquelle il est fait allusion à la fin du Chapitre Premier, le lait de Maïs avait été réparti dans les milieux de culture à raison de 5, 10 et 15 % (1). Les tissus de Carotte ont proliféré abondamment sur ces milieux, donnant des cals dont l'accroissement est de 100 %, 370 % et 274 % plus important que ceux des témoins sans AIA ni lait de Maïs. Le maximum de croissance se trouve, dans le cas de ce tissu, à la concentration 10 % en lait de Maïs.

Cette action du lait de Maïs est constante et a été contrôlée très souvent. Le Tableau I donne les résultats d'une de ces expé-

TABLEAU I

*Action du lait de Maïs sur les tissus d'une souche normale de Carotte.
Comparaison avec l'action de l'auxine.*

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	2,3	1
Témoin avec AIA 0,1 ppm	3,2	1,3
Lait de Maïs 10 %	6,8	2,9

riences de contrôle. Dans celui-ci et les tableaux suivants, les poids de substance fraîche (P.F.) en fin d'expérience sont rapportés à 1000 mg de tissu frais pris comme unité de poids au début de l'expérience (= P.F. ‰). Ceci permet une comparaison facile des résultats d'une expérience à l'autre et d'un tissu à l'autre. Il est possible de calculer ainsi très rapidement un *coefficient d'accroissement absolu*. Un coefficient d'accroissement calculé à partir du poids atteint par le témoin sans auxine pris comme unité donne ce qu'on appelle ici « *le coefficient d'accroissement relatif* ».

(1) Lorsqu'il s'agit du lait de Maïs ou de ses fractions, 5 %, 10 %, 15 %, etc. signifie que dans 100 ml de milieu de culture, il a été ajouté au milieu de base 5, 10, 15 ml de lait de Maïs, de telle sorte que les éléments apportés par le milieu de base se trouvent à la concentration normale des milieux témoins:

Bien que moins considérable dans cette expérience que dans la première citée, l'action du lait de Maïs demeure très notable, et les cals formés sur le milieu contenant cet extrait atteignent 290% du témoin : le temps de culture est de 30 jours à température constante (20°C) et en lumière diffuse. Les tissus formés sont fermes, et légèrement chlorophylliens comme ceux des témoins. Dans toutes les expériences est préparé un milieu témoin contenant de l'auxine à 0,1 ppm. Cette dose d'auxine est celle qui donne les meilleurs résultats et l'expérience rapportée ici montre nettement que l'action du lait de Maïs est plus importante. Si le lait de Maïs contient de l'auxine ou des substances analogues, cela ne suffit pas à rendre compte de son action sur les tissus de Carotte. Ces tissus sont très sensibles à la présence de l'AIA, et un excès de cette substance agit comme un inhibiteur.

Dans un des extraits de Maïs étudiés, Mlle Z. KULESCHA fit un dosage d'auxine au moyen du test Avoine de Went. Elle mit en évidence l'équivalent de 40 ppm d'AIA (communication personnelle 1951). Cette dose très forte suffirait à expliquer que les concentrations du lait de Maïs supérieures à 10% soient inhibitrices pour les tissus normaux de Carotte. A cette concentration en effet, le lait de Maïs pour lequel le dosage a été fait, apporte l'équivalent de 4 ppm d'auxine, soit 40 fois la dose normale pour les tissus de Carotte.

Il semblait évident que l'action du lait de Maïs ne relève pas seulement des auxines naturelles qu'il apporte dans les milieux de culture. Cependant, les tissus de Carotte qui peuvent se développer même sans auxine, ne permettent pas de conclure sur ce point avec certitude. Il fallait pour cela un tissu ayant un besoin absolu d'auxine pour se développer.

2. Action sur les tissus de Topinambour.

Les tissus de tubercule de Topinambour en période hivernale sont incapables de proliférer si l'auxine est absente du milieu de culture (GAUTHERET, 1942).

Ce matériel biologique présente donc les caractéristiques indispensables qui permettent de vérifier l'hypothèse précédente selon laquelle l'action du lait de Maïs est également due à d'autres substances que des auxines.

Lorsque le lait de Maïs est introduit à raison de 5,10 et 25% dans les milieux de culture il apporte, selon le dosage de Mlle KULESCHA, l'équivalent de 2 ppm, 4 ppm et 10 ppm d'auxine (1). Des

(1) Il s'agit encore de l'extrait où Mlle Z. KULESCHA a fait le dosage d'auxine. Il est certain que cette quantité est variable avec les récoltes et les variétés de Maïs.

milieux témoins correspondant à ces concentrations théoriques d'auxine sont préparés avec de l'acide indole-acétique, ainsi qu'une série témoin sans auxine ni lait de Maïs. Le tout est autoclavé 20 minutes à 120°C.

Dans cette expérience, 12 fragments de tubercule de Topinambour pesant 5000 mg furent utilisés pour chaque série. Après trente jours, les cultures furent pesées et la croissance rapportée à 1000 mg de tissu frais au départ de l'expérience. Le coefficient d'accroissement absolu et le coefficient d'accroissement relatif sont seuls présentés (Tableau II).

TABLEAU II

Action du lait de Maïs comparée à celle de l'auxine sur les tissus de tubercule de Topinambour (VAR. « Rouge fuseau »).

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	1,2	1
Témoin+AIA (moyenne), (voir ci-dessus le texte).	3,2	2,6
Lait de Maïs 5 %	7	5,8
Lait de Maïs 10 %	9,5	7,9
Lait de Maïs 25 %	10,3	8,5

Les morceaux de Topinambour repiqués sur le milieu contenant 10 ppm d'auxine se sont nécrosés et il n'a pu en être tenu compte. Les différences de croissance entre les tissus cultivés sur les milieux contenant soit 2 et soit 4 ppm d'auxine n'ont pas été suffisantes pour être significatives. C'est donc la moyenne des 24 explantats qui est indiquée dans le Tableau II. Ces concentrations en AIA sont déjà très élevées pour les tissus de Topinambour. Dans la suite, des concentrations aussi fortes d'auxine ne sont plus utilisées. Les résultats de l'expérience rapportée ci-dessus montrent que les auxines du lait de Maïs ne suffisent pas à expliquer la stimulation de croissance provoquée par cet extrait dans les cultures de tissus végétaux. L'activité du lait de Maïs dépend donc de facteurs de croissance différents des auxines connues.

Il est important de noter que les variétés de Topinambour ne présentent pas toutes la même sensibilité à l'auxine. Les variétés « Rouge fuseau » du Jardin Botanique de la Faculté de Pharmacie de Lyon, et « Rouge de Gouvieux » réagissent pratiquement de la

même manière. Mais la variété « Piedalu 17 » étudiée par NITSCH, est beaucoup plus sensible. Le Tableau III donne les résultats d'une étude de cette dernière variété avec du lait de Maïs et de l'auxine.

TABLEAU III

Action comparée du lait de Maïs et de l'AIA sur les tissus de tubercule de Topinambour (Variété « Piedalu 17 »).

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	1,57	1
Témoin + AIA (0,1 ppm) ..	8,87	5,6
Lait de Maïs 15 %	20,54	13,0

Ce tableau montre que l'accroissement des tissus de la variété « Piedalu 17 » cultivée avec de l'auxine seule est le double de ce qui est obtenu habituellement avec les deux autres variétés de Topinambour. Pour ces variétés, le maximum de croissance est atteint lorsqu'il y a dans les milieux de culture 0,5 ppm d'AIA. Ce maximum d'accroissement absolu dépasse rarement 3,8.

3. Action sur les tissus de moelle de Tabac.

La moelle de Tabac n'a pas été utilisée au début de ces recherches. Ce n'est que plus tard, lorsque le lait de Maïs était déjà fractionné en 3 groupes, que ce matériel biologique a été introduit dans les expériences.

Les tissus de Carotte et les tissus de Topinambour réagissent par des divisions cellulaires aussi bien à l'auxine qu'au lait de Maïs. A un certain point de la recherche, il était nécessaire de pouvoir distinguer entre substances agissant surtout sur le grandissement cellulaire, et substances favorisant la division cellulaire (1). La moelle de Tabac Wisconsin 38, étudiée par JABLONSKI et SKOOG (1954) présente des caractéristiques qui en font un matériel de choix pour cela.

(1) Par division cellulaire, il s'agit ici :

a) soit de simple reclonement après division du noyau, sans grandissement cellulaire rétablissant les dimensions initiales des cellules mères.

b) soit de reclonement après division du noyau, suivi de grandissement rétablissant les dimensions des cellules initiales.

c) soit enfin de cellules nouvelles, nées de division du noyau et de reclonement dont la taille dépasse celle des cellules mères.

En présence d'AIA ou de substances analogues, la moelle de Tabac reagit surtout par un grandissement des cellules (auxésis). Le tissu prend alors un aspect « éclaté » caractéristique (voir Pl. I, fig. 1, 2 et 3). Ce tissu est très fragile et il est très difficile d'y faire des coupes anatomiques donnant de belles préparations. Au contraire, en présence du lait de Maïs, il se développe, à partir de la moelle, un tissu dense, compact, formé de multitudes de petites cellules. Le développement de ce cal est lent au début, mais après 30 jours, sa croissance s'accélère au point de prendre l'aspect du développement d'un feutre mycélien (Pl. I, fig. 4). Sur les courbes de croissance une nette cassure après le 30^e jour indique le départ de cette accélération, dans le développement des cals (courbes I et II).

Dans le cas le plus défavorable (courbe I), un cylindre de moelle de Tabac de 6 mm de diamètre et de 5 mm de long, pesant 67,5 mg au départ de l'expérience, le 6 septembre 1957, atteint 96 mg le 7 octobre en présence de 15% du lait de Maïs. Le témoin correspondant en présence de 2 ppm d'AIA atteint 110 mg dans le même temps. Mais le poids de substance sèche (P.S.) est plus élevé pour les tissus cultivés en présence du lait de Maïs : 9 mg contre 6 mg pour les témoins. L'expérience destinée à obtenir une courbe de croissance, s'est poursuivie jusqu'au 6 janvier 1958. Malheureusement, il n'a pu être établi, sur une aussi longue durée, de courbe correspondant au tissu de moelle de Tabac cultivé uniquement en présence d'auxine. Ces tissus gorgés d'eau se dessèchent à la longue.

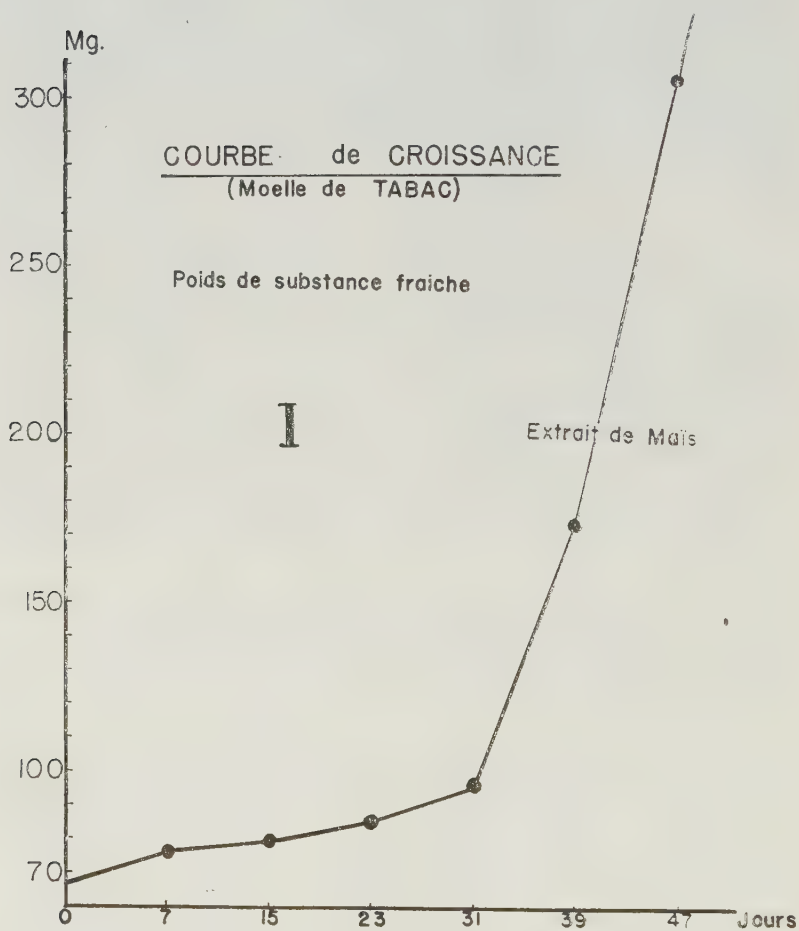
Quant au tissu cultivé en présence du lait de Maïs, il atteignait 739 mg, par morceau après deux mois, 1211 mg après 68 jours, 2160 mg après 80 jours, 2846 mg après 87 jours, 3247 mg après 94 jours, 3379 mg après 101 jours et finalement 3587 mg après 4 mois.

Il est possible de se rendre compte de la vitesse de croissance : elle est de moins de 1 mg par jour pendant le premier mois, ensuite de 21 mg le deuxième mois, puis elle atteint 67,4 mg par jour, 73 mg par jour, 98 mg par jour (maximum) du 25 novembre au 2 décembre. La vitesse retombe ensuite à 57,2 mg par jour, à 18 mg par jour, et finalement à 9,9 mg par jour au moment où l'expérience touche à sa fin. Cette chute de vitesse de croissance peut venir simplement de l'épuisement du milieu et des tubes devenus trop étroits pour les cals devenus énormes et commençant à se nécroser.

De tels tissus repiqués sur un milieu ne contenant aucune substance de croissance sont capables de continuer à proliférer. Cette capacité qui peut se prolonger pendant au moins 2 repiquages, semble liée à la grosseur des fragments repiqués (Pl. II, fig. 5).

Ces tissus repiqués sur un milieu ne contenant que de l'auxine, continuent à se diviser sans réagir comme la moelle initiale par un grandissement cellulaire caractéristique (Pl. LIII, fig. 6).

Ce phénomène mérite une étude spéciale. Il se peut qu'il



Croissance de tissus de moelle de Tabac cultivés sur 15 % de lait de Maïs.
Poids moyen par explantat.

corresponde à ce que GAUTHERET a constaté pour les tissus de Carotte « accoutumés » aux auxines. Des études se poursuivent sur ce point.

Conclusions.

Les cultures de tissus de Carotte ont permis de mettre en évidence l'action stimulatrice de croissance du lait de Maïs. Il pouvait être déjà supposé que cette activité ne relevait pas seulement d'une concentration favorable d'auxines naturelles.

Le comportement des tissus de Topinambour cultivés sur le même extrait confirme que la stimulation de croissance décelée est due à des substances autres que des auxines.

Plus tard, les cultures de moelle de Tabac (test plus qualitatif que quantitatif) révèlent la présence de substances favorisant la division cellulaire.

CHAPITRE IVPREMIERS ESSAIS DE FRACTIONNEMENT
DU LAIT DE MAÏS

Le chapitre précédent conclut à la présence, dans le lait de Maïs, de substances de croissance différentes des auxines. Il fallait chercher le moyen de fractionner cet extrait complexe. L'épreuve de la chaleur et la dialyse devaient préciser si cette activité était liée à des protéines, et un traitement à l'éther devait extraire notamment les auxines.

1. *Effet de la chaleur.*

Les milieux de cultures sont stérilisés à 120°C. Les expériences précédentes permettaient de croire que ce traitement n'avait pas d'effet sur l'activité du lait de Maïs. Il était cependant nécessaire d'en faire la vérification et de prévoir les limites de résistance à la chaleur de cet extrait. Dans ce but, les 3 séries de milieux de culture suivant sont préparées :

Milieux A. — Le lait de Maïs est stérilisé par ultrafiltration sur bougie Chamberland puis introduit dans les milieux de culture stérilisés à part à 120°C.

Milieux B. — Le lait de Maïs est introduit dans les milieux et stérilisé à 120°C.

Milieux C. — Le lait de Maïs subit d'abord seul une stérilisation à 120°C, pendant 20 minutes, puis est introduit dans les milieux de culture et subit une seconde fois l'épreuve de la température de la stérilisation (= lait de Maïs stérilisé 2 fois du Tableau IV).

Chaque série de milieux reçoit 5,10 et 25 % du lait de Maïs.

Des témoins correspondants avec et sans AIA sont aussi préparés.

Les tubercules de Topinambour fournissent les tissus nécessaires à l'expérience. Après 30 jours, le poids des cultures est rapporté comme d'habitude à 1000 mg de tissus frais au départ de l'expérience. Le Tableau IV rassemble les résultats de cette expérience.

Il ressort de ces données que, par rapport à l'extrait n'ayant pas subi l'épreuve de la chaleur, le lait de Maïs à la concentration de 10 % perd environ 20 % de son activité après une stérilisation avec les milieux de culture, et de l'ordre de 60 % après 2 stérilisations. Cette perte d'activité peut s'expliquer de différentes manières.

La chaleur peut être cause :

- 1° d'une destruction partielle d'un principe actif (thermostabilité relative) ;
- 2° dans le cas de plusieurs facteurs de croissance : de destruction de l'un d'entre eux ;
- 3° de libération d'une substance inhibitrice ;
- 4° ou de ces différents phénomènes à la fois.

TABLEAU IV

Action comparée du lait de Maïs stérilisé par ultrafiltration et du lait de Maïs ayant subi une simple ou une double stérilisation à 120°C. — Matériel biologique utilisé (var. « Rouge fuseau » de Lyon). (Les nombres correspondant au poids en mg de 10 explantats).

	Sans AIA	Avec AIA 0,5 ppm	Avec lait de Maïs		
			5 %	10 %	25 %
Témoin	1500	3700			
Lait de Maïs stér. s bougie			9900	13500	
Lait de Maïs stér. 120°C			9500	10600	11500
Lait de Maïs stér. 2 fois				5600 à 6000	6500 à 7000

L'analyse du Tableau IV permet cependant d'avoir une opinion de ce qui se passe : à la concentration « 5 % », la différence entre l'extrait stérilisé par ultrafiltration et celui stérilisé une seule fois à 120°C. est faible. Cette différence augmente à « 10 % ».

Ceci pourrait s'expliquer soit par la destruction d'un facteur limitant, ou l'apparition d'une substance inhibitrice dont l'action se manifesterait davantage aux concentrations plus élevées. Dans le cas de la simple stérilisation à 120°C, s'il y a destruction de substance active, cette destruction serait relativement peu importante, puisque aux faibles concentrations il y a peu de différence entre le lait de Maïs qui a été stérilisé par ultrafiltration et le lait de Maïs ayant subi une simple stérilisation à 120°C.

Il n'en va pas de même sans doute dans le cas de la double stérilisation à 120°C.

Un seul passage à 120°C n'altère pas tellement le lait de Maïs pour que ce procédé de stérilisation doive être écarté : et, à cause de son efficacité, il n'a pas cessé d'être employé par la suite.

Au cours de la stérilisation à la chaleur des protéines coagulent et précipitent. Elles sont éliminées par centrifugation. L'action du surnageant et du précipité est étudiée sur le développement

TABLEAU V

Formation par la chaleur d'un coagulum protéinique à partir du lait de Maïs. Action de ce précipité sur les tissus de Topinambour (var. « Rouge fuseau ») comparée à celle du surnageant d'où il est séparé. (Les résultats sont donnés en PF. %.)

Témoin + AIA 0,5 ppm	Coagulum	Surnageant 10 %
3300	4000	6300

des cultures de tissus séparément. Le Tableau V donne les résultats de cette expérience. L'action du précipité n'apparaît pas vraiment significative. Elle peut venir d'un lavage insuffisant du précipité qui a entraîné, dans sa masse, des traces de substances actives. Le lavage a été effectué en remettant en suspension dans l'eau le précipité, puis en filtrant. L'opération a été répétée plusieurs fois, mais le contrôle de fin de lavage était difficile à faire.

2. Effet de la Dialyse.

L'effet de la chaleur sur le lait de Maïs prouve que son activité n'est pas, pour une part au moins, liée aux protéines. En soumettant cet extrait à la dialyse, cette conclusion devait être vérifiée.

Dans cette expérience, le sac de dialyse a été fait sur place à partir d'une solution de collodion, 200 ml de lait de Maïs frais y

sont introduits pour être dialysés entre 0° et 4°C. contre 1400 ml d'eau distillée. L'activité du dialysat et celle du résidu du sac où il s'est formé un précipité, sont étudiées sur les cultures de tissus de Topinambour. Les résultats montrent que des substances responsables de l'activité du lait de Maïs traversent les membranes de dialyse. L'activité que manifeste encore l'adialysable peut s'expliquer par une dialyse insuffisante (Tableau VI).

TABLEAU VI

Dialyse du lait de Maïs : étude de l'activité du dialysat et de l'adialysable sur les cultures de tissus de Topinambour.

	Coefficient d'accroissement	absolu
Témoin sans AIA	1,8	
Témoin + AIA 0,4 ppm	3,2	
Lait de Maïs 25 %	8,7	
Dialysat 25 %	8,2	
Adialysable	4,5	

Si intéressants que soient les résultats obtenus avec cette technique, il n'est pas possible de la conserver pour fractionner le lait de Maïs. Une dialyse contre de l'eau ne peut se faire qu'aux environs de 0°C. Des actions enzymatiques très importantes risquent d'intervenir qui modifieraient l'extrait étudié. Des développements bactériens peuvent également se produire si la dialyse doit se prolonger pour que son effet soit total. Ces considérations l'ont fait abandonner au moins dans les conditions définies ici.

Conclusion.

1° L'activité du lait de Maïs n'est pas détruite par la stérilisation à 120°C. Elle n'est que faiblement réduite (de l'ordre de 20%).

2° Les substances responsables de cette activité traversent les membranes de dialyse : cette activité ne peut donc être liée à une structure protidique. Ceci est en accord avec l'action de la chaleur.

3. Extraction à l'éther.

Mlle Z. KULESCHA avait dosé, dans cet extrait de Maïs, une teneur en « auxines » équivalente à 40 ppm d'acide indolacétique.

Pour débarrasser le lait de Maïs de ces substances, la technique suivante est utilisée :

Le lait de Maïs brut amené à pH 2 ou 3 par de l'acide chlorhydrique, est épuisé à l'éther dépéroxydé par extraction continue liquide/liquide pendant 24 heures à l'obscurité (d'après VAN OVERBEEK, 1944). Le même traitement est appliqué au dialysat du lait de Maïs.

PAVILLARD (1953) a appliqué une extraction analogue aux tissus de Pomme de terre et de Tomate dont il étudiait les variations des quantités d'auxines « libres » et « liées » au cours de viroses.

Les deux tableaux suivants rassemblent les résultats obtenus avec les tissus de Topinambour cultivés en présence de lait de Maïs brut traité et non traité à l'éther (Tableau VII), et ceux que

TABLEAU VII

Action comparée du lait de Maïs traité à l'éther et non traité à l'éther sur les cultures de tissus de Topinambour (var. « Rouge fuseau »).

	Coefficient d'accroissement absolu
Témoin sans AIA.	1,6
Témoin + AIA 0,4 ppm.	3,4
Maïs traité à l'éther 5 %.....	6,7
Maïs traité à l'éther 25 %.....	8,1
Maïs frais 25 %.....	8,8

donnent les tissus normaux de Carotte cultivés sur l'extrait dialysé traité et non traité à l'éther (Tableau VIII).

TABLEAU VIII

Action comparée d'un dialysat du lait de Maïs traité et non traité à l'éther sur le développement des cultures de tissus de Carotte. (Souche de GAUTHERET).

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	5,9	1
Témoin + AIA 0,1 ppm....	9,1	1,5
Dialysat non traité à l'éther 10 %.....	19,5	3,3
Dialysat traité éther 10 %..	28,6	4,8

Le tissu de Topinambour n'indique pas une différence notable d'activité entre le lait de Maïs brut non traité et celui traité à l'éther.

Les résultats obtenus avec les tissus de Carotte, au contraire des tissus de Topinambour, manifestent une grande différence d'activité entre le dialysat non traité à l'éther et le même extrait traité à l'éther.

Ceci s'explique par la grande sensibilité aux auxines des tissus normaux de Carotte. Les doses apportées par le lait de Maïs dans les milieux de culture sont très fortes pour ces tissus. Il est donc normal qu'un traitement diminuant la teneur en auxine du lait de Maïs rende celui-ci plus actif vis-à-vis des tissus normaux de Carotte. Cette expérience prouve d'une manière définitive que les auxines ne sont responsables que d'une partie de l'activité du lait de Maïs.

La technique d'extraction à l'éther n'a pas été conservée, car elle n'est pas spécifique. Une analyse des substances entraînées par l'éther est faite à l'aide d'une chromatographie unidimensionnelle ascendante dans le solvant n-butanol/eau (NH_3) (50/50). Sur ces chromatogrammes, outre la coloration de l'AIA obtenue par le réactif de SALKOWSKI modifié par PACHECO (1951), apparaît une longue traînée violette révélée par la ninhydrine : ce qui indique la présence d'abondants acides aminés.

Les cultures faites sur les substances entraînées par l'éther ne donnent aucun résultat positif, et semblent indiquer plutôt la présence de substances inhibitrices.

Conclusion.

Ni la chaleur, ni la dialyse, ni l'éther ne permettent d'obtenir de séparation spécifique des constituants du lait de Maïs. En conséquence, une autre technique, très différente, est utilisée : elle fait appel non plus aux propriétés physiques des corps, mais à leurs propriétés chimiques.

DEUXIÈME PARTIE

FRACTIONNEMENT

PAR RÉSINES SYNTHÉTIQUES ÉCHANGEURS D'IONS

CHAPITRE PREMIER

PREMIERS ESSAIS DE FRACTIONNEMENT DU LAIT DE MAÏS PAR ÉCHANGEURS D'IONS

C'est d'une technique publiée par BOULANGER et BISERTE en 1951 que s'inspirent les premiers essais de fractionnement du lait de Maïs à l'aide de résines échangeurs d'ions (BEAUCHESNE et NETIEN, 1952 et NETIEN et BEAUCHESNE, 1954).

L'usage des échangeurs d'ions dans le domaine des recherches sur les substances de croissance n'était pas encore très répandu, et les premières publications concernant l'emploi des échangeurs d'ions dans l'étude des milieux biologiques ne remontent guère au-delà de 1942. BLOCK, à cette époque, utilise des échangeurs pour l'analyse et la purification d'hydrolysats de caséine (1942).

Ceux qui s'efforcent déjà d'isoler les substances actives du lait de Coco et d'autres extraits biologiques actifs, se servent de techniques de séparation classique (SHANTZ et STEWARD, 1952).

1. *Précisions techniques*

Au cours de ces tentatives de fractionnement du lait de Maïs, différents types d'échangeurs furent essayés.

Parmi les échangeurs de cations, il suffira de citer ceux qui ont été conservés. Ils ont en général des qualités équivalentes. Ce sont tous des co-polymères de polystyrène et divinylbenzène sulfonés. Les échangeurs forts Permutite 50, Dowex 50, Amberlite IR 120, sont employés indifféremment.

Un échangeur acide faible : IRC 50 a été également essayé.

La capacité d'échange est de 2 m. eq/ml pour les échangeurs forts, et de 3,5 m eq/ml pour les échangeurs faibles.

La capacité d'échange efficace (filtrat totalement dépourvu de cations) est de 85% de la capacité totale.

Le choix des échangeurs d'anions est plus délicat. Il y a des différences importantes entre eux. Les échangeurs forts : Deacidite A 300 D et Dowex 2 ont donné les meilleurs résultats, mais ces résines sont plus fragiles que Dowex 1, Dowex 21 K ou Amberlite IRA 401. Cette dernière résine est plus poreuse.

La Dowex 2 présente un groupement éthanol dans sa molécule, et cela semble lui conférer des propriétés d'échange moins fortes qui l'ont fait préférer aux autres dans la technique générale de fractionnement. Des échangeurs d'anions faibles, Amberlite IR 45 ou Dowex 3, ont été également essayés.

La capacité d'échange est de 0,9 à 1 m. eq/ml pour les échangeurs basiques forts et de 2 m. eq/ml pour les échangeurs basiques faibles. La capacité d'échange efficace est seulement de 60 à 66 %.

La technique d'activation de ces échangeurs synthétiques est classique. L'acide chlorhydrique à 10% est utilisé pour régénérer la forme $R-SO_3-H^+$ des échangeurs de cations, et la soude à 4% pour régénérer la forme $R-N(R')_3+OH^-$ des échangeurs d'anions. Les quantités de régénérants calculés dans l'un et l'autre cas, correspondent au triple de la capacité totale des échangeurs traités. Soit 6 m. eq/ml d'acide chlorhydrique pur pour les échangeurs forts de cations, et 3 m. eq/ml de soude pure pour les échangeurs basiques forts (1).

2. Séparation et analyse d'une fraction cationique.

Du lait de Maïs est versé sur une colonne de résine échangeur de cations, « Permutite 50 », sous sa forme $R-SO_3-H^+$. Le filtrat au bas de la colonne est acide (pH 2 à 3). Outre les acides, il contient les auxines et les substances neutres. Après rinçage, les éléments retenus par la colonne sont élués à l'aide d'une solution ammoniacale 2 N. Cet éluat contient tous les cations organiques.

Une partie de cette fraction a été analysée en chromatographie bidimensionnelle, sur papier, selon la méthode de CONSDEN, GORDON et MARTIN, telle qu'elle est décrite par LEDERER (1949), BOULANGER et BISERTE (1950), STEWARD et THOMPSON (1950), THOMPSON et STEWARD (1951) et THOMPSON, ZACHARIUS et STEWARD (1951), CHAMPIGNY (1960).

Le n-butanol/acide acétique saturé d'eau (40 : 10 : 50) et le phénol saturé d'eau ont été utilisés comme solvants. Le papier employé est le Whatman n° 1. A l'aide de cette technique, un certain nombre d'acides aminés ont été déterminés de deux manières différentes :

1. par des co-chromatographies répétées,
2. par des comparaisons avec des cartes établies pour les solvants indiqués.

(1) Il y a actuellement de nombreuses publications concernant les différents types d'échangeurs d'ions existants et leur utilisation. Les producteurs éditent des monographies sur chaque échangeur (ROHM et HAAS, The Dow Chemical Co, Chemical Process Company, etc.). Des ouvrages techniques existent également (LEDERER et LEDERER, 1957, LEDERER, 1960, SAMUELSON, 1953, NACHOD et SHUBERT, 1956, KITCHENER, 1957, KUNIN, 1958).

De plus, pour en faciliter l'analyse, selon un procédé inspiré de BISERTE (1950), à l'aide de colonnes d'échangeurs tamponnés à différents pH, les acides aminés ont été séparés en acides aminés acides, basiques et neutres.

Certains isolés, ont été caractérisés par des réactions spécifiques : l'arginine par la réaction de SAKAGUCHI, l'histidine par la réaction de PAULY et la lysine comme ne donnant pas de réaction positive à la réaction de SAKAGUCHI et précipitant au réactif phosphotungstique (1).

La chromatographie bidimensionnelle permettait de conclure à la présence de : l' α -alanine, l'acide γ -aminobutyrique, l'acide aspartique, l'acide glutamique. Ces quatre acides aminés étant de beaucoup les plus abondants.

D'après l'importance des taches viennent ensuite : la sérine, le glycocole, la thréonine, la tyrosine, β -alanine, la valine, la proline et la lysine. En quantité moindre : l'asparagine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine et les leucines. Quatre autres taches n'ont pu être déterminées. Le tryptophane et l'acide cystéique ne sont décelés qu'à partir d'extraits très concentrés. Par ailleurs, la réaction du biuret a été positive, quoique très faiblement. Ces résultats proviennent d'une analyse faite sur un extrait de Maïs immature, de la région lyonnaise (BEAUCHESNE et NETIEN, 1952).

Une étude plus récente des acides aminés d'un lait de Maïs « Golden Bantam » a montré que la composition en acides aminés de cet extrait était peu différente. La chromatographie bidimensionnelle représentée (Pl. III, fig. 1 et 2) a été faite dans les systèmes solvants suivants :

Phénol saturé d'eau/ NH_3 dans la première dimension, et 2-4-6 collidine, 2-4 lutidine (V/V) saturée d'eau dans la seconde dimension (DENT, 1948).

Les chromatogrammes séchés ont été traités par une solution de ninhydrine à 1% dans un mélange butanol/éthanol (50/50) auquel avait été ajouté 1 ml de pyridine. La révélation des taches a été faite à 70° C.

Dans le lait de Maïs qu'ils étudient, GYORFFI REDEI et Mme REDEI (1955) identifièrent également les mêmes acides aminés à quelques variantes près (en particulier : ils n'ont pas noté d'acide γ -aminobutyrique, ni d'asparagine, qui ont été identifiés dans le lait de Maïs étudié au cours de ces recherches.

Celles-ci peuvent être dues à un stade différent du développement du grain ou plus simplement à la différence d'espèce de Maïs étudié.

(1) Cette détermination a été faite avec le concours de M. J. LOISELET, au laboratoire du Professeur R. GREYSEL, de la Faculté de Médecine de Lyon.

3. *Essais d'activité de la fraction cationique.*

Tandis qu'une part de l'éluat cationique était soumise à l'analyse chromatographique, le reste était introduit dans des milieux de culture, afin de voir si cette fraction favorisait encore la croissance des tissus de Topinambour (Pl. V, fig. 11) et des tissus normaux de Carotte « in vitro ».

TABLEAU IX

Action sur les tissus de Topinambour (var. « Rouge fuseau »), de deux fractions résultant d'un traitement du lait de Maïs par un échangeur de cations (Le filtrat contient les substances acides et les substances neutres).

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	1,29	1
Témoin + AIA 0,5 ppm....	3,65	2,8
Lait de Maïs 10 %	6,19	4,7
Eluat cationique sans AIA .	5,50	4,2
Eluat cationique + AIA 0,5 ppm.....	6,70	5,1
Filtrat sans AIA.....	4,40	3,4
Filtrat + AIA 0,5 ppm	4,50	3,4
Filtrat + Eluat cationique..	5,60	4,3
Filtrat + Eluat cationique + AIA 0,5 ppm.....	7,66	5,9

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans les tableaux IX et X. Dans le premier sont rapportés également les résultats provenant de cultures faites avec le « filtrat acide », recueilli au bas de l'échangeur. Cette fraction, après neutralisation, a été introduite dans les milieux de culture de tissus de Topinambour.

D'après ces résultats obtenus avec les tissus de Topinambour, les acides aminés apportés par le lait de Maïs pourraient donc être responsables de l'activité de la fraction cationique (éluat cationique du tableau IX).

Le filtrat acide contenant les auxines et les substances neutres, ne manifeste pas une activité tellement plus importante que celle du témoin avec 0,5 ppm d'AIA. La fraction cationique est remar-

quable par son activité propre, activité qui est encore augmentée en présence d'AIA à 0,5 ppm.

TABLEAU X

Action de la fraction cationique du lait de Maïs sur le développement des tissus normaux de Carotte.

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	2,3	1
Témoin + AIA 0,1 ppm....	3,2	1,3
Lait de Maïs 10 %	6,8	2,9
Eluat cationique sans AIA .	4,3	1,9
Eluat cationique + AIA 0,1 ppm.....	7,00	3,3

Le tableau X rapporte les résultats obtenus avec les tissus normaux de Carotte.

4. Activité de la fraction cationique comparée à celle d'un milieu synthétique d'acides aminés.

L'analyse chromatographique de la fraction cationique y révèle la présence de nombreux acides aminés. Il importe de savoir si la stimulation de croissance du lait de Maïs est due à la présence de ces corps.

Pour déterminer le rôle qui revient aux acides aminés dans l'activité de cette fraction, des cultures de tissus ont été faites sur un milieu synthétique, dont la composition, à titre d'essai, est pour 1000 ml de milieu : acide glutamique 20 mg, acide γ -aminobutyrique 20 mg, α -alanine 12 mg, méthionine 11 mg, acide aspartique 10 mg, asparagine 8 mg, proline 6 mg, arginine 5 mg. Ces quantités ont été déterminées approximativement d'après l'importance des taches sur les chromatogrammes d'acides aminés du lait de Maïs.

Les tissus de Carotte ont réagi positivement sur le milieu synthétique d'acides aminés, alors que les tissus de Topinambour (var. « Rouge fuseau ») n'ont pas réagi.

Le tableau XI montre que les tissus normaux de Carotte cultivés sur un milieu synthétique d'acides aminés répondent par une augmentation de croissance supérieure à celle obtenue en présence de la fraction cationique du lait de Maïs.

TABLEAU XI

Action comparée sur le développement des tissus normaux de Carotte de la fraction cationique du lait de Maïs, et d'un milieu synthétique d'acides aminés.

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	3,0	1
Témoin + AIA 0,1 ppm	5,0	1,6
Fraction cationique sans AIA	9,0	3
Fraction cationique + AIA . . .	11,0	3,6
Acides aminés (synthèse) sans AIA	9,6	3,2
Acides aminés (synthèse) + AIA 0,1 ppm	13,8	4,8

Ces résultats ne permettent cependant aucune conclusion concernant le rôle des acides aminés dans l'activité de la fraction cationique.

La réaction positive des tissus normaux de Carotte, pourrait indiquer que l'activité de la fraction cationique est due aux acides aminés de cette fraction. Ceci est en accord avec ce que PARIS et DUHAMET (1953) et PARIS, DUHAMET et GORIS (1954) ont trouvé au cours de leur recherche sur le lait de Coco. Ils ont établi que le mélange de onze acides aminés contenus dans le lait de Coco, stimule très efficacement en présence d'auxine, la prolifération des tissus normaux de Carotte et des tissus de Crown-gall de Scorsnère.

Pour ces derniers tissus en particulier, le mélange est parfois plus efficace que le lait de Coco. Les auteurs concluaient alors, en attribuant à un mélange d'acides aminés et de vitamines connues, à l'activité du lait de Coco.

Dans l'expérience rapportée ici, les tissus de Topinambour (Rouge fuseau) ne manifestèrent aucune réaction positive en présence du milieu synthétique d'acides aminés, alors que sur la fraction cationique la prolifération de ces tissus est considérable. Toutefois, le mélange synthétique ne représente pas la totalité de la fraction cationique.

Il est difficile de lui comparer les résultats qu'obtiennent RUKER et GUTSCHE (1948) qui étudient systématiquement l'action de plusieurs acides aminés pris l'un après l'autre sur les cultures de tissus tumoraux de Soleil. D'après ces auteurs, certains acides

aminés sont sans effet, d'autres peuvent remplacer les ions nitriques (alanine, glycine, arginine, acide glutamique, acide aspartique et asparagine). Les études de NITSCH et C. NITSCH (1957) sur le Topinambour « Piedalu 17 », aboutissent à des conclusions analogues. Seul le tryptophane aurait une place à part, car il peut se transformer en acide indole acétique (KULESCHA, 1951).

Des auteurs ont également introduit de l'hydrolysate de caséine dans les milieux de culture de tissus végétaux : SHANTZ et STEWARD (1952), STEWARD et SHANTZ (1954) pour les cultures de phloème de Carotte et de tissus de Pomme de terre, HENDERSON, DURREL et BONNER (1952), pour les cultures de tissus normaux de Soleil, et NITSCH et C. NITSCH (1957) pour les cultures de tissus de Topinambour. L'augmentation de poids de substance fraîche obtenue dans ces différents cas est faible. STEWARD et SHANTZ (1955) montrent que cette croissance est due non à une multiplication cellulaire mais à un grandissement des cellules.

Les résultats de ces différentes études ne sont aucunement comparables à ceux qui ont été obtenus avec les tissus de Topinambour cultivés sur la fraction cationique totale du lait de Maïs.

Dans le cas de la présente recherche, il ne semblait pas possible de tirer de ces résultats une conclusion concernant le rôle des acides aminés dans l'activité du lait de Maïs.

Mais un résultat positif a été obtenu au cours de cette expérience : le fractionnement du lait de Maïs par échangeurs d'ions permet une séparation spécifique des substances actives sur la croissance d'après leurs propriétés chimiques. Le procédé mérite donc d'être conservé pour la poursuite de l'analyse des constituants du lait de Maïs.

Remarque

Dans les expériences dont il a été question jusqu'ici, le lait de Maïs était soit stérilisé à 120°C. soit conservé au froid à -20°C. Dans les expériences dont il sera question maintenant, le lait de Maïs étudié provient d'un extrait hydroalcoolique préparé comme il est dit au chapitre II.

L'extrait hydroalcoolique du lait de Maïs peut être traité directement par les échangeurs d'ions. Le fait que la solution soit alcoolique ne gêne pas l'échange en ce qui concerne les acides aminés, et par ailleurs, se trouvent déjà éliminées la plupart des protéines qui risquent d'interférer au cours de l'échange même.

CHAPITRE II

FRACTIONNEMENT DU LAIT DE MAÏS
EN TROIS GROUPES
DE SUBSTANCES ACTIVES PAR ÉCHANGEURS D'IONS
SUCCESSIFS : DOWEX 50 - DOWEX 2

Les résultats rapportés au chapitre précédent sont assez concluants quant à l'efficacité de la technique, pour que celle-ci soit améliorée en vue d'un fractionnement plus complet.

Jusqu'à ce moment les échangeurs basiques forts n'avaient pas été utilisés dans la séparation des substances du lait de Maïs. Leur emploi permet d'obtenir 3 fractions à partir de cet extrait.

1. *Technique.*

Deux colonnes d'échangeurs de 6 cm de diamètre, contenant l'une 1500 ml, d'échangeur acide Dowex 50, et l'autre 1500 ml d'échangeur basique Dowex 2, sont préparées. La première est traitée par de l'acide chlorhydrique à 10%, la seconde par de la soude à 4%, selon la technique générale indiquée. Puis, elles sont rincées à l'eau désionisée jusqu'à neutralité de l'eau de rinçage.

L'extrait hydroalcoolique du lait de Maïs est versé sur la colonne d'échangeur acide. Tous les cations métalliques et organiques sont fixés. Au bas de la colonne, le filtrat est acide (pH 2,3 à 3). Ce filtrat, auquel sont ajoutées les eaux de rinçage, est alors versé sur la colonne d'échangeur basique. Tous les acides sont retenus, même les plus faibles. Le filtrat de cette seconde colonne sort neutre ou légèrement basique. Le filtrat neutre auquel sont jointes les premières eaux de rinçage de l'échangeur basique constitue la *fraction neutre*.

Les colonnes d'échangeurs sont éluées, la première par $\text{NH}_4\text{OH}/2\text{N}$ et la seconde par NaOH/N .

La fraction ammoniacale (cationique) est évaporée sous vide, tandis que l'éluat sodique de la fraction anionique est traité par un échangeur de cations afin d'éliminer les ions Na^+ . (Cette fraction constitue la *fraction acide*).

De cette manière, qui est très générale (v. g. JOLCHINE, 1956) trois groupes de substances chimiquement différentes sont obtenus :

a) Un groupe basique contenant tous les acides aminés, sans doute avec des polypeptides de faible poids moléculaire, (réaction du biuret positive).

b) Un groupe acide, contenant en particulier les auxines naturelles acides.

c) Une fraction neutre contenant des glucides, des lipides, quelques peptides, et quelques grosses molécules adialysables (les prolamines végétales sont en effet solubles dans l'alcool à 60% ou 80%).

La fraction acide n'a pas été analysée dans le cadre de cette recherche, de nombreux auteurs parmi lesquels BERGER et coll. (1944), STOWE et THIMANN (1953), HEMBERG (1955), l'ont déjà largement étudiée, ainsi que tout récemment encore GRENOT (1959). Certains de ces auteurs (STOWE, 1954 et KEFFORD, 1955) en ont isolé et caractérisé l'acide β -indole acétique, et ont indiqué qu'il s'y trouvait aussi plusieurs composés indoliques non caractérisés. Mais les résultats obtenus depuis dix ans laissent penser que le problème des auxines du Maïs immature est loin d'être résolu, car seul l'acide β -indole acétique a été caractérisé avec certitude. Les autres substances demeurent indéterminées.

2. Essais biologiques des fractions obtenues.

Sur les cultures de moelle de Tabac, la fraction acide a été essayée. La réaction du tissu a été tout à fait semblable à celle provoquée par l'auxine : tissu gorgé d'eau et cellules géantes.

La fraction neutre et la fraction basique se montrent très actives sur les tissus de Topinambour et les tissus de moelle de Tabac.

Le développement des cultures de moelle de Tabac indique la présence de substances stimulant la division cellulaire dans les groupes basiques (éluat Dowex 50) et neutre.

Le tableau XII rassemble les résultats obtenus avec les tissus de Topinambour (var. « Rouge fuseau ») cultivés en présence de la fraction neutre, de la fraction basique et des deux mélangées.

Le tableau XII appelle quelques remarques.

Il a été dit au début de ce mémoire que la croissance des cultures de tissus serait exprimée au cours de ce travail en poids de substance fraîche (P.F.) et parfois en poids de substance sèche (P.S.) bien que ce soit là deux expressions incomplètes du phénomène complexe de la croissance.

En effet, la première inclut les variations de la teneur en eau des cellules qui ne sont pas toujours corrélatives de l'accroissement protoplasmique, et la seconde juxtapose l'accroissement du protoplasme et celui du paroplasme. Ces deux expressions peuvent être prises pour signifier une vraie croissance, mais elles sont ambiguës, puisqu'elles ne distinguent pas entre des phénomènes aussi différents que l'hydratation, les synthèses protoplasmiques et les synthèses paroplasmales.

Les relations exprimées dans le tableau XII illustrent bien

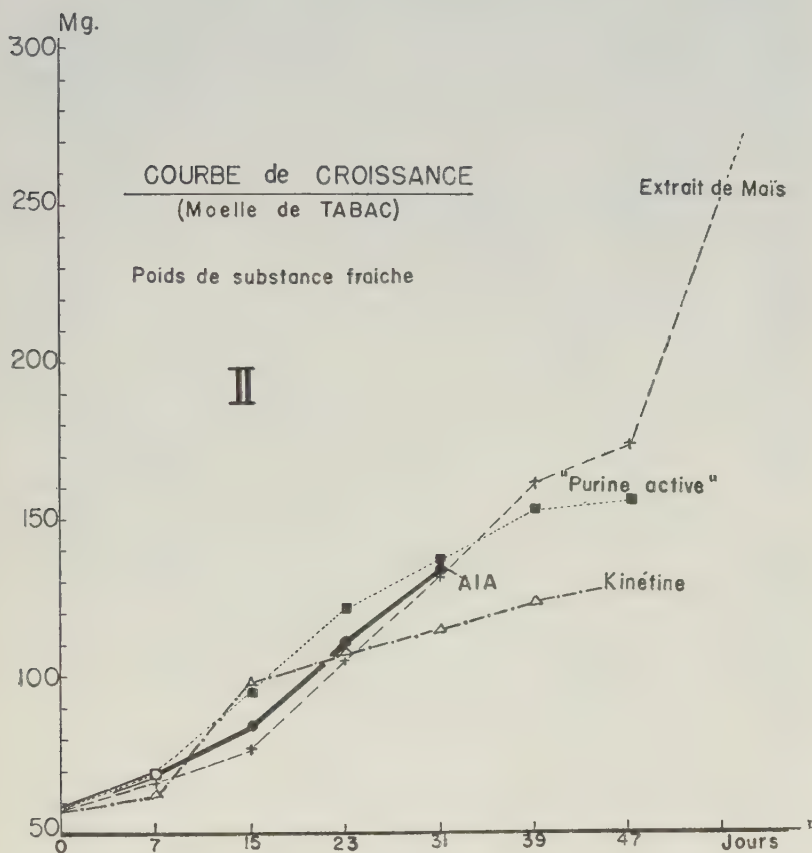
TABLEAU XII

Action comparée des fractions basique et neutre et du mélange des deux, avec ou sans AIA, sur le développement des tissus de tubercules de Topinambour (var. « Rouge fureau »).

	P.F. %	P.S.	H ₂ O % de P.S.	$\frac{\text{P.S.}}{\text{P.F.}}$	Coefficient d'accroisse- ment relatif au témoin sans AIA	Coefficient d'accroisse- ment relatif au témoin + AIA	Rapport P.S. au témoin sans AIA	Rapport P.S. au témoin + AIA
(témoins)	1879	429	337	0,228	1		1	
T+AIA 0,5 ppm ...	3500	518	570	0,148	1,86	1	1,20	1
Maïs total 10 %	7891	891	780	0,113	4,19	2,25	2,07	1,72
Fraction basique	7655	854	790	0,110	4,07	2,18	1,99	1,64
Fraction basique + AIA 0,5 ppm...	8100	956	740	0,118	4,31	2,31	2,22	1,84
Fraction neutre	5664	781	620	0,138	3,01	1,61	1,82	1,50
Fraction neutre + AIA 0,5 ppm....	5982	819	630	0,137	3,18	1,70	1,90	1,58
Fraction basique + fraction neutre .	8503	1385	513	0,163	4,52	2,42	3,22	2,67
Fraction basique + fraction neutre . + AIA 0,5 ppm....	7767	954	714	0,128	4,13	2,21	2,22	1,84

ces deux points, mais cependant il s'en dégage une signification objective de vraie croissance.

Les tissus cultivés sur le lait de Maïs total et sur la fraction basique avec ou sans auxine, atteignent des poids de substance



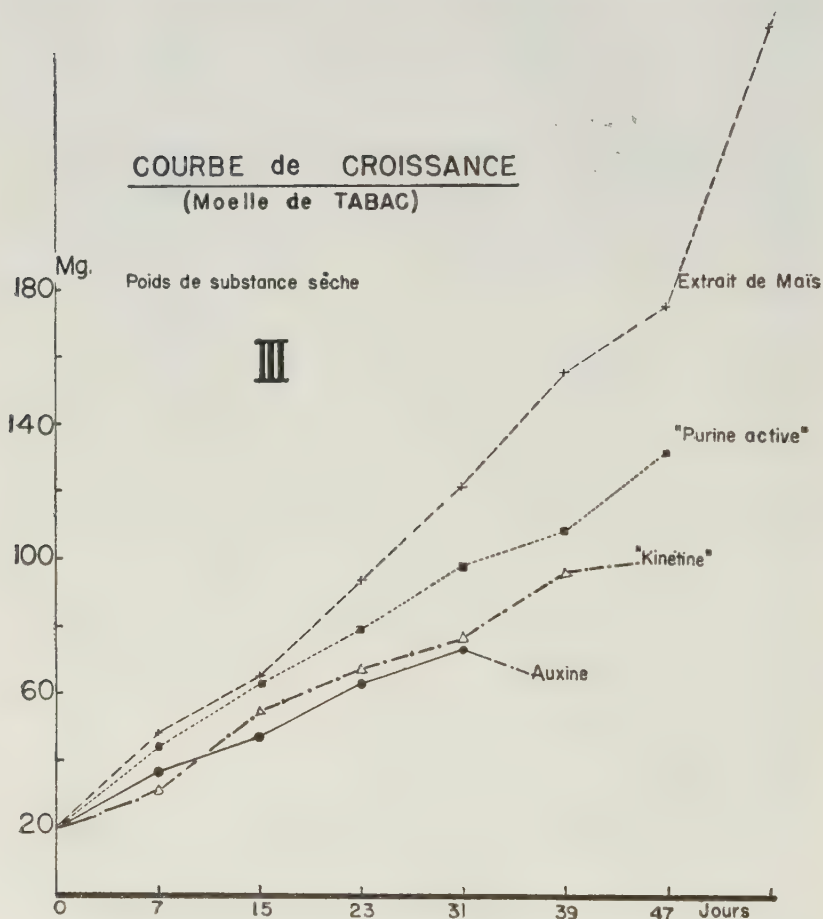
Croissance de tissus de moelle de Tabac sur « kinéline », sur « purine active » avec AIA, et AIA seul, et lait de Maïs (poids moyen par explantat).

fraîche qui sont plus de 4 fois celui du témoin sans substance de croissance.

Les poids de substance sèche correspondant ne sont que 2 fois celui du témoin. Cette différence vient d'une augmentation considérable de la teneur en eau, qui retentit sur le P.F. (780.

790, 740% par rapport au poids de substance sèche). Le témoin sans auxine n'a que 337% d'eau.

Les P.F. des tissus cultivés sur la fraction neutre, avec ou sans auxine, ne sont que 3 fois environ celui du témoin, soit 1/4



Croissance en poids de substance sèche correspondant à la courbe II. Poids de 10 explantats.

en moins par rapport au P.F. des tissus cultivés sur le lait de Maïs, ou sa fraction basique. Par contre, la différence des P.S. est faible, car la teneur en eau est moindre dans ces tissus (620%). Il y a eu

là proportionnellement plus de synthèses que dans le cas des autres tissus.

Les tissus cultivés sur le mélange « fraction basique - fraction neutre » atteignent un P.F. qui est 4,5 fois plus grand que le P.F. du témoin sans auxine et un P.S. qui est 3,2 fois celui du témoin. La teneur en eau est de 513% inférieure à celle des tissus cultivés sur auxine seule. Il apparaît, dans ce cas, encore plus nettement que dans les cas précédents, la marque d'une activité de synthèse importante. Cela n'est nettement signifié que par le P.S. mais il est impossible de dire si cette activité de synthèse se passe au niveau du protoplasme ou du paraplasme ou au niveau des deux.

Si au mélange « fraction basique - fraction neutre » est ajouté de l'auxine (AIA), le P.F. de tissus cultivés diminue légèrement, tandis que le P.S. passe de 3,2 fois celui du témoin à 2,2. Corrélativement, il y a eu une très forte augmentation de la teneur en eau qui passe de 513% à 714%. La fraction neutre est très riche en glucides solubles. La matière sèche qui apparaît dans les tissus cultivés sur le mélange « fraction basique - fraction neutre » sans auxine, pourrait correspondre à de la matière paraplasmique. L'adjonction d'auxine entraîne une diminution dans l'accroissement de la substance sèche et une augmentation de teneur en eau.

Ces considérations montrent combien il est difficile de trouver un critère unique de croissance. THIMANN la définit « *irreversible increase in volume* » (1960). Cet aspect exclut par exemple une activité de division cellulaire qui ne se manifesterait par aucune augmentation de volume, comme cela peut se produire. Il y aurait eu cependant, sans aucun doute, une augmentation de la masse des noyaux. HELLER (1953), LANCE (1957), GAUTHERET (1959) et LIORET (1960) qui ont examiné différentes expressions courantes de la croissance, concluent qu'il est souvent nécessaire, pour saisir la croissance, de se référer à plusieurs critères : P.F., P.S., N protéique, ARN, ADN, nombre des cellules, etc.

Dans le cas de la présente recherche, cependant, il est permis de considérer que la mesure d'accroissement de substance fraîche est généralement suffisante pour apprécier réellement la croissance (*cf* Tableau XII).

Quant aux tissus de moelle de Tabac, ils ne réagissent que lentement à la fraction cationique. Des cals très denses et relativement peu développés apparaissent à la surface des fragments de tissus. Des coupes histologiques révèlent qu'un recloisonnement s'est produit à l'intérieur des cellules du tissu primitif (BEAUCHESNE, 1957). En même temps, des cellules appartenant aux deux ou trois assises les plus externes, entrent en division et sont à l'origine des cals formés à l'extérieur. Ces cals sont constitués de très petites cellules souvent polynucléées. L'adjonction d'auxine

favorise nettement l'action de la fraction cationique sur les tissus de moelle de Tabac, mais les cellules formées demeurent aussi petites, qu'il y ait ou non de l'AIA (Pl. IV, fig. 12).

Les techniques utilisant des échangeurs forts séparés, en colonnes successives, présentent des inconvénients, en particulier de sévères changements de pH se produisent dans les milieux biologiques au cours de leur passage sur les colonnes d'échangeurs. Par ailleurs, les échangeurs basiques forts retiennent même des oses, réducteurs ou non, et seraient cause d'oxydations qui font apparaître, dans les éluats, des acides organiques qui n'existeraient pas naturellement dans les milieux étudiés. (ROSEMAN, ABELES et DORFMAN (1952) et HUME (1953).

3. Action des échangeurs forts sur des oses réducteurs ou non.

Ni la fraction basique, ni la fraction neutre du lait de Maïs, ne sont des produits d'élution de tels échangeurs : mais une étude systématique du comportement des échangeurs basiques forts vis-à-vis du glucose, fructose et saccharose a été jugée nécessaire avant la mise au point d'une technique nouvelle. Ces trois glucides choisis parce qu'ils se rencontrent très souvent dans les extraits végétaux, l'ont été également pour leur fragilité chimique, d'une part, et leur constitution moléculaire comportant des groupements fonctionnels différents, d'autre part.

Le comportement des échangeurs basiques les plus forts : Dowex 21 K et Amberlite IRA 401, ainsi que celui de l'échangeur acide IR 120, vis-à-vis de ces glucides a été étudié.

Une solution relativement concentrée de chacun de ces glucides a été utilisée en prévision des dilutions inévitables dans la suite de l'expérience.

L'acidité ou la basicité des solutions avant passage, et lorsque c'était possible, après passage, sur les échangeurs ont été dosées.

Les solutions de glucose et de fructose étaient parfaitement neutres, et la solution de saccharose a montré une basicité insignifiante correspondant à 0,0001 N. Aucun changement mesurable de pH n'est apparu dans le filtrat. Les solutions étaient faites à partir de produits chimiquement purs.

Les résultats obtenus avec chacun des échangeurs d'ions cités sont rassemblés dans le tableau suivant. Le glucose et le fructose ont été dosés selon la méthode de Bertrand. L'apparition du saccharose dans l'éluat ou le filtrat a été vérifiée en essayant simplement de mettre en évidence un réducteur avant et après hydrolyse. Ni dans l'éluat, ni dans le filtrat, il n'est apparu de réducteur avant l'hydrolyse. Le dosage de ce glucide n'a pas été fait.

TABLEAU XIII

191 *Étude du comportement du glucose, fructose et saccharose au cours de leur passage sur différents échangeurs basiques forts (IRA, Dowex 21 K) et acides forts (Amberlite IR 120). — Influence de l'état sur des modifications possibles de ces corps.*

	Acidité après passage sur échangeurs	Basacité après passage sur échangeurs	Réducteur avant passage sur échangeurs (dosé)	Réducteur dans le filtrat (dosé)	Réducteur dans l'éluat (dosé)
IRA 120 (H ⁺)					
Saccharose	0	0	0	0	0
Fructose.....	0	0	200 mg	200 mg	0
Glucose.....	0	0	200 mg	200 mg	0
IRA 401 (OH ⁻)					
Saccharose (élution sodique).....	0	0	0	0	180 mg
Fructose (élution sodique)	0	0	200 mg	0	200 mg
Glucose (élution ClH)	0	0	200 mg	0	200 mg
Dowex 21 K (OH ⁻).					
Fructose (élution sodique)	0	0	200 mg	0	190 mg
Glucose (élution ClH).....	0	0	200 mg	0	200 mg
Fructose (élution au bicarbonate)	0	0	200 mg	0	200 mg
Lit mélangé IR 120 IRA 401 Fructose + ClNa en contact avec les échangeurs (une nuit)	0	0	200 mg	199 mg	0

L'échangeur acide IR 120 ne fixe aucun des glucides étudiés, le pH des solutions n'a pas changé, et la solution de saccharose ne montre aucune trace de réducteur.

Par contre, les échangeurs basiques forts (IRA 401 et Dowex 21 K fixent tous les glucides, et ce n'est pas une simple adsorption mécanique, car il n'est possible de déceler aucune trace de ces glucides dans les eaux de lavage. Les glucides, réducteurs ou non, sont retenus par ce type d'échangeur à la manière des acides.

Dans les deux heures qui ont suivi l'adsorption, l'élution des glucides a été faite soit avec de la soude/N, soit avec une solution saturée de bicarbonate d'ammonium, soit avec de l'acide chlorhydrique 2 N.

Aucune trace de réducteur n'est apparue dans l'élution sodique du saccharose. Sa présence dans l'éluat a été mise en évidence par hydrolyse et réduction de la liqueur de Fehling. Une solution contenant 200 mg de sucre réducteur avait été versée sur chaque résine. La totalité des réducteurs se retrouve dans l'élution acide. Mais l'élution sodique qui est plus longue accuse une perte de 5 à 10%. Ceci vient sans doute d'une oxydation provoquée par l'éluat sodique lui-même. Dans une solution sodique de glucose ou de fructose, il apparaît de l'acide lactique, cette dégradation sodique des oses est bien connue (PIGMAN et GOEPP, 1948. BOULANGER et POLONOVSKI, 1959). Lorsque le fructose est élué non plus par de la soude mais par du bicarbonate d'ammonium à saturation, la totalité du fructose apparaît dans l'éluat.

De même, aucune destruction de ce sucre ne se produit lorsqu'il reste en contact prolongé avec une colonne d'échangeurs forts mélangés, en présence de NaCl. Il n'est pas fixé par les échangeurs, ou s'il était fixé, NaCl qui l'accompagne l'élue au fur et à mesure de la progression de la solution dans la colonne d'échangeurs. Le réducteur est dosé dans le filtrat, et la quantité totale initiale s'y retrouve à très peu de chose près (199 pour 200).

Il est possible de conclure que les échangeurs sont moins dangereux que les éluats eux-mêmes pour les corps tels que fructose, saccharose et glucose — dans les conditions d'utilisation des résines. Ces glucides ne sont pas fixés par les échangeurs si les solutions étudiées contiennent des substances plus actives vis-à-vis des échangeurs.

Certaines limites d'utilisation des échangeurs basiques forts ainsi précisées, il a été mis au point une technique évitant les changements de pH dans les milieux biologiques, au cours du traitement par les échangeurs.

CHAPITRE III

FRACTIONNEMENT DU LAIT DE MAÏS EN TROIS GROUPES DE SUBSTANCES PAR ÉCHANGEURS MÉLANGÉS

1. *Technique de séparation du lait de Maïs par échangeurs mélangés.*

a) *Préparation du lit d'échangeurs mélangés.* — Deux échangeurs forts, l'un acide (IR 120), l'autre basique (Dowex 2) sont préparés séparément selon la technique habituelle de régénération : l'échangeur acide est traité par HCl à 10 %, l'échangeur basique par NaOH à 4 %, puis chacun est rincé jusqu'à neutralité. Après ce traitement, les deux échangeurs sont vidés des colonnes où ils sont préparés et reçus dans un seul récipient — un Becher de 3 litres par exemple — où ils sont mélangés intimement avant d'être versés dans la colonne où doit être traité le lait de Maïs. Dans le lit ainsi préparé, chacun des échangeurs est en excès par rapport à la quantité d'extrait à traiter. Pour des volumes d'extraits nécessitant de grandes quantités d'échangeurs, des colonnes en plexiglas, larges de 150 mm et hautes de 1000 mm, comme celles des déminéraliseurs « Site », offrent des avantages. Dans ce type de colonne, des échangeurs séparés d'après leur densité par un courant d'eau, peuvent être réactivés sur place sans qu'il soit nécessaire de les sortir de la colonne où ils seront mélangés. C'est le principe des « mixed beds » commerciaux en usage pour désioniser l'eau.

b) *Traitement du lait de Maïs.* — Le lait de Maïs est versé sur une colonne d'échangeurs mélangés contenant 900 ml de résine cationique et 1500 ml de résine anionique. Le filtrat recueilli au bas de la colonne constitue la *fraction neutre*.

Après le passage de l'extrait de Maïs, la colonne d'échangeurs mélangés est rincée, et les premières eaux de lavage sont jointes à la fraction neutre.

Le rinçage est fait soit par un courant ascendant d'eau, soit par un courant ascendant d'alcool à 50 %. Ce dernier procédé enlève plus facilement les substances hydroalcool-solubles qui adhèrent mécaniquement aux échangeurs. Le courant ascendant est produit par une trompe à vide qui crée une dépression au sommet de la colonne, et aspire ainsi les liquides nécessaires au rinçage préparés au bas de la colonne. Sur le trajet, entre le sommet de la colonne et la trompe à eau, une grande fiole à vide recueille les liquides de lavage. Lorsque les eaux de lavage ne contiennent plus de trace de réducteurs, les substances fixées sur les échangeurs sont éluées.

2. Elution des substances fixées sur les échangeurs d'ions.

Il n'est pas nécessaire de séparer les échangeurs à éluer et il est possible de faire soit une élution globale des substances fixées par les échangeurs, soit une élution sélective.

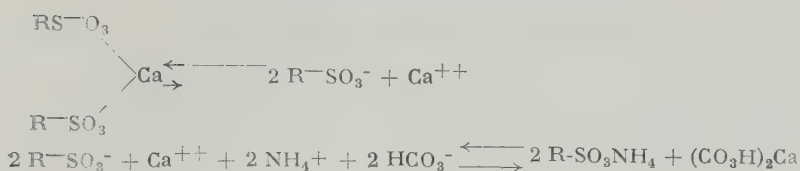
a) *Elution globale des substances fixées sur les échangeurs mélangés.* — Une solution saturée de bicarbonate d'ammonium préparée immédiatement avant l'emploi est versée sur le lit d'échangeurs mélangés. L'élution est arrêtée lorsqu'il n'est plus possible de détecter de traces d'acides aminés dans l'éluat avec la ninhydrine.

Le pH de cette solution est d'environ 7,5 ou 8, la dissolution de NH_4HCO_3 dans l'eau y maintient une température assez basse (4 à 5°C). L'élution peut donc se faire dans de bonnes conditions de pH et de température.

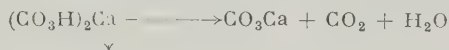
Les ions NH_4^+ n'agissent que sur la résine IR 120. Ils éluent les bases organiques et les acides aminés retenus par cet échangeur. Les ions HCO_3^- agissent sur la résine basique Dowex 2, d'où ils éluent les acides organiques et les acides aminés. En effet, l'affinité des résines basiques fortes pour l'ion $\text{CO}_3^{=}$ place celui-ci immédiatement après l'ion Cl^- . Pour la plupart de ces échangeurs, $\text{CO}_3^{=}$ se trouve avant les acides organiques dans l'échelle des activités. Il a été vérifié que les ions $\text{CO}_3^{=}$ déplaçaient les acides organiques tels que l'acide tartrique, caractérisé dans l'éluat par la réaction de Moehler (1). Un simple barbotage de gaz CO_2 dans une colonne d'échangeurs, provoque une élution analogue, mais très lentement, car la concentration des molécules ionisées est trop faible pour que ce procédé soit efficace. Les ions NH_4^+ n'ont aucune action sur les échangeurs basiques forts, même du type Dowex 2. L'élution du lit mélangé par le bicarbonate d'ammonium rassemble donc en un seul éluat les acides organiques et les bases organiques. Il est peu probable que $\text{CO}_3^{=}$ fasse apparaître des acides minéraux : par contre NH_4^+ libère des traces d'ions métalliques.

Cet éluat est concentré sous vide pour en chasser les ions NH_4^+ et HCO_3^- . Il arrive que des carbonates métalliques précipitent au cours des éluations. Les ions et les échangeurs sont en effet en équilibre dans la phase liquide et les réactions suivantes peuvent se produire :

(1) Réaction de Moehler : la Résorcine en présence de H_2SO_4 concentré donne une coloration violette intense avec l'acide tartrique, en chauffant doucement.



Les ions $(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ca}$ se transforment en carbonate et CO_3Ca précipite, surtout au cours de la concentration sous vide.



Après concentration sous vide, l'éluat au bicarbonate est dilué avec de l'alcool éthylique, de telle sorte que la teneur en alcool soit de 50%, puis il est filtré sur Büchner. Dans le liquide ainsi clarifié, quelques gouttes d'acide chlorhydrique peuvent être ajoutées pour décomposer les carbonates qui resteraient encore en solution, mais il faut que le pH final ne descende pas au-dessous de pH 7. Cette précaution est nécessaire pour éviter les ruptures de colonnes d'échangeurs dans le traitement suivant.

La solution hydroalcoolique ainsi obtenue, est versée sur une colonne d'échangeur acide IR 120, préparée selon la technique ordinaire. L'échangeur acide échange ses ions H^+ contre toutes les bases organiques et les acides aminés même dicarboxyliques. Le filtrat ne contient que les acides organiques dont les auxines acides. Les premières eaux de rinçage de la colonne sont jointes au filtrat acide qui est concentré sous vide et amené ensuite à 50% alcoolique avec de l'éthanol. Ceci constitue la *Fraction acide*.

Ensuite, tous les corps organiques retenus par la colonne d'échangeur acide sont élués par $\text{NH}_4\text{OH}/2\text{N}$.

Au cours d'essais préliminaires pour séparer la fraction basique en ses constituants, des réactions spécifiques avaient révélé la présence de purines auxquelles pourrait être liée une activité de division cellulaire. C'est pourquoi cette élution est suivie au spectrophotomètre enregistreur Beckman DK 2, en même temps que par des essais à la ninhydrine.

Cette élution peut se prolonger, car l'adénine est difficile à éluer par l'ammoniaque ainsi que l'arginine. Une élution à l'acide chlorhydrique normal est plus rapide, mais présente l'inconvénient d'abaisser brutalement le pH de l'éluat. Il est également plus difficile d'éliminer l'acide chlorhydrique que les ions NH_4^+ en excès. Dans le cas présent, c'est toujours l'ammoniaque qui a servi d'éluat. L'éluat ammoniacal est concentré sous vide, dilué par l'alcool à 50% et concentré de nouveau, pour chasser totalement les traces d'ammoniaque. Finalement, avec de l'étha-

nol, il est amené à 50% alcoolique. Ceci constitue la *Fraction basique*.

A la suite de l'élution globale du lit d'échangeurs mélangés par le bicarbonate d'ammonium, et du fractionnement ultérieur sur Amberlite IR 120, les constituants du lait de Maïs sont répartis en 3 fractions : *neutre*, *acide*, *basique*. La fraction basique dans ce cas comprend les bases organiques et tous les acides aminés. Les fractions obtenues par ce procédé correspondent à celles du fractionnement par échangeurs séparés.

b) *Elution sélective des substances fixées sur les échangeurs mélangés*. — Dans ce procédé, l'élution des substances fixées sur les échangeurs mélangés est faite en deux temps :

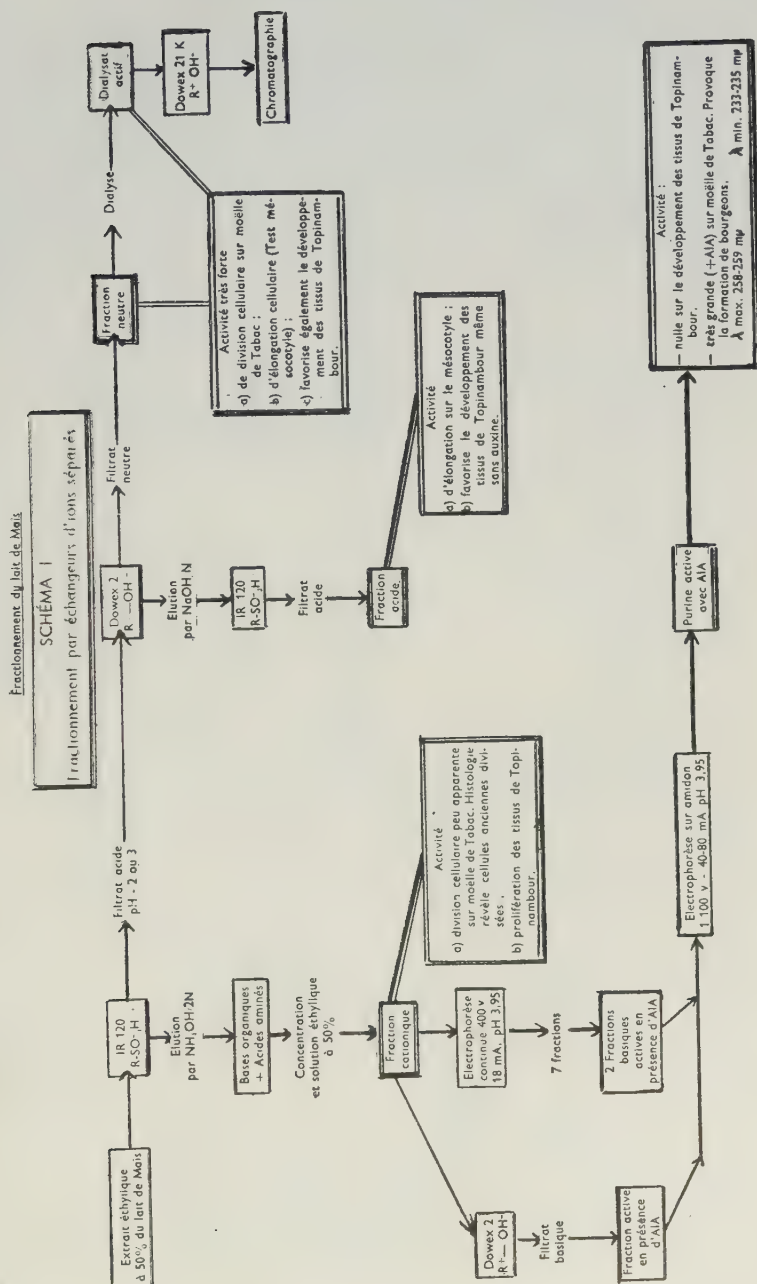
1° Une solution ammoniacale 2 N est versée en premier lieu sur la colonne d'échangeurs. Ainsi sont élués uniquement les corps fixés sur l'échangeur acide IR 120. Cet éluat contiendra les bases organiques, les acides aminés de pHi basique et une part de certains acides aminés (surtout α -alanine, acide γ -aminobutyrique, valine et proline) se trouvant proche de leur pHi dans la solution traitée. L'élution est suivie au spectrophotomètre Beckman DK 2, entre 340 et 220 m μ pour déceler la présence des purines auxquelles pourrait être liée l'activité de division cellulaire de cette fraction.

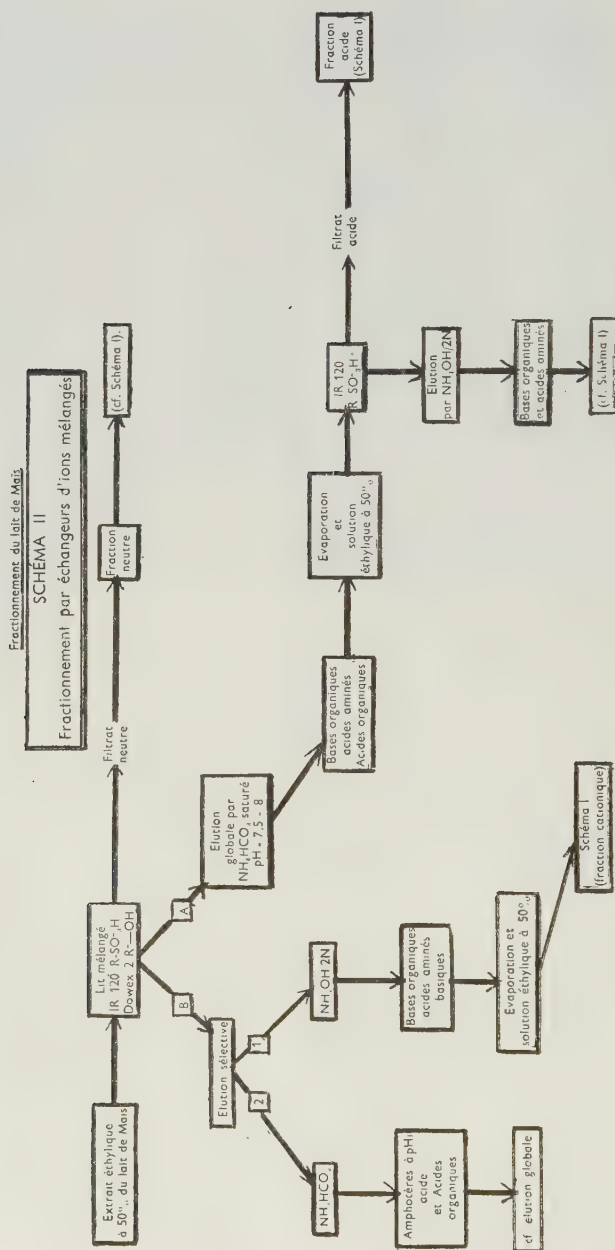
2° Lorsque cette élution est terminée, et la colonne rincée jusqu'à neutralité, une solution saturée de bicarbonate d'ammonium est versée sur la colonne d'échangeurs comme dans le cas de l'élution globale.

L'éluat ammoniacal et l'éluat au bicarbonate sont concentrés sous vide et redilués par de l'éthanol afin que chacune des solutions soient finalement à 50% alcoolique. L'éluat au bicarbonate est ensuite traité par un échangeur d'ions acide IR 120, ce qui ramène exactement au cas de l'élution globale. De cette manière, ce n'est plus en trois, mais en quatre fractions que les constituants du lait de Maïs sont répartis.

a) *Fraction neutre* (filtrat du lit mélangé) ; b) *Fraction basique* (éluat ammoniacal) ; c) *Fraction des amphotères* de pHi acide (éluées par le bicarbonate, puis fixées par l'Amberlite IR 120) et *basique* (éluat ammoniacal) ; c) *Fraction des amphotères* (élués par le bicarbonate, puis fixée par l'Amberlite IR 120 de pHi acide) et d) *Fraction acide*.

Ce second mode d'élution est plus long : mais il a l'avantage de faire une séparation entre les amphotères d'après leur pHi. En effet, les amphotères semblent se fixer sur l'un ou l'autre échangeur, selon la dissociation de leur radical acide ou basique dans le milieu (v.g. : les dicarboxyliques sont fixés sur l'échangeur anio-





nique, les acides aminés basiques sur l'échangeur cationique : mais, en particulier l' α -alanine, l'acide γ -aminobutyrique, la proline et la valine se fixent sur l'un et l'autre échangeurs).

Il se peut que des corps s'y trouvant en équilibre entre deux formes de dissociation (telles que les formes lactime ou lactame de certaines bases nucléiques contenant un hydroxyle, comme l'uracile, la cytosine ou la guanine), se fixent sur l'un des échangeurs d'après leur forme « basique » ou « neutre », et sur l'autre d'après leur forme « acide ». Aucun changement de pH n'intervenant au cours du passage sur le lit d'échangeurs mélangés, les équilibres ioniques sont respectés.

S'il s'agissait d'étudier l'équilibre ionique qui s'établit entre les différentes formes moléculaires d'une même substance dans un liquide biologique tel que le lait de Maïs, cette technique offrirait un moyen d'investigation possible.

Pour isoler le facteur responsable de l'activité de stimulation de croissance présent dans le groupe basique, il ne semble pas nécessaire de se servir de l'éluion sélective. D'une part, le groupe de substances où se trouve l'activité est long à éluer par l'ammoniaque ; et, d'autre part, une quantité non négligeable de ces substances semble réagir à la manière des acides en se fixant sur la résine basique. En effet, une activité de division cellulaire est manifestée par la fraction cationique de l'éluat au bicarbonate, de l'éluion sélective.

L'éluion globale au bicarbonate d'ammonium est donc préférable : ainsi se trouve rassemblée en une seule fraction toute l'activité de division cellulaire de la fraction cationique.

Les fractions essayées sur les tissus de moelle de Tabac manifestent une activité analogue à celle des fractions similaires obtenues avec la technique utilisant les échangeurs en lits séparés. Il semble cependant qu'apparaissent, avec les échangeurs mélangés, des activités de croissance qui ne se manifestaient pas après le traitement par les échangeurs séparés.

Les activités des différentes fractions obtenues ont été éprouvées selon la technique habituelle des cultures de tissus (moelle de Tabac). D'une manière tout à fait exceptionnelle, des essais rapides d'activité auxinique ont été faits sur chaque fraction à l'aide du test mésocotyle de NITSCH (1956). Ces tests ont été faits sur des dilutions (1/10, 1/100, 1/1000) de chaque fraction sans aucune séparation chromatographique. Des fragments de 4 mm de mésocotyle d'avoine, mis à tremper dans des solutions tamponnées contenant des substances d'élongation, réagissent à ces substances par un allongement qui peut aller jusqu'au triple et parfois au quadruple de leur longueur initiale après 22 heures.

— Le test a réagi positivement pour toutes les fractions dans le cas de l'élu-tion globale.

— Dans le cas de l'*élution sélective*, la fraction cationique de l'élu-tion au bicarbonate (2^e éluat) n'a pas toujours donné de réponse positive au test mésocotyle. Il reste donc un doute à son sujet. Les trois autres fractions réagissent positivement.

— Dans le cas du fractionnement par échangeurs séparés, la fraction neutre a toujours manifesté une très grande activité sur le test mésocotyle. La fraction acide qui contient les « auxines acides », réagit positivement à condition que l'élu-tion soit faite aussitôt après le passage de l'extrait à traiter, et de préférence par un éluat doux (carbonate, bicarbonate ou acide organique). Si l'éluat est constitué par de la soude, la perte d'activité peut être considérable. Mais elle demeure décelable, et peut agir sur les cultures de tissus de moelle de Tabac, si le fractionnement et l'élu-tion sont menés rapidement. Dans le cas d'échangeurs séparés, jamais la fraction basique n'a montré l'activité d'élongation cellulaire. Ces activités auxiniques qui apparaissent dans les éluats « cationiques » des lits mélangés, permettent de penser que des destructions intervenaient dans la technique des lits séparés d'échangeurs, qui ne se produisent plus avec les lits mélangés.

Les activités de division cellulaire restent réparties entre les groupes basique et neutre comme avec les échangeurs séparés. Cependant, l'*élution sélective* semble couper en deux l'activité de l'éluat cationique puisqu'une activité de division cellulaire se retrouve dans l'éluat ammoniacal et dans la fraction cationique de l'éluat au bicarbonate. C'est pourquoi, la suite du fractionnement du lait de Maïs a été faite en utilisant la technique d'élu-tion globale au bicarbonate d'ammonium.

c) *Activités de croissance de ces fractions obtenues avec les échangeurs mélangés.* — I. *Fractions provenant de l'élu-tion globale par NH_4HCO_3 saturé :*

Fraction neutre. — Cette fraction manifeste sur la moelle de Tabac une activité de division cellulaire identique à celle de la fraction neutre obtenue avec la méthode utilisant les échangeurs séparés. Il est probable que la fraction neutre (filtrat des colonnes d'échangeurs) est la même dans tous les cas.

Fraction acide. — Le mode d'élu-tion du lit mélangé n'intervient pas sur la composition de cette fraction. En effet, elle est le filtrat d'une colonne d'échangeur fort IR 120, utilisé pour fixer les bases organiques et les acides aminés de l'éluat au bicarbonate. Ce filtrat acide constitue la fraction acide.

Lorsque le lait de Maïs est traité avec un lit d'échangeurs mélangés, cette fraction manifeste une activité d'élongation cel-

lulaire sur le mésocotyle d'Avoine beaucoup plus importante que dans le cas du traitement par lits séparés d'échangeurs forts. Elle manifeste également une très légère activité de division cellulaire sur la moelle de Tabac. Ceci cependant doit être étudié de nouveau.

Fraction basique. — Cette fraction provient de l'élution ammoniacale de la colonne d'Amberlite IR 120, utilisée pour fixer les bases de l'éluat au bicarbonate. Cette fraction correspond exactement à la fraction cationique obtenue avec la technique des échangeurs séparés. Toutefois, des activités très fortes d'élongation cellulaire qui n'avaient pas été décelées avec la première technique, apparaissent dans ce groupe. Il s'agirait de substances basiques ou amphotères présentant une activité auxinique sur le test mésocotyle.

Au point de vue activité de division cellulaire, cette fraction est identique à celle qui est obtenue avec la technique d'échangeurs successifs : activité de division cellulaire lente à se manifester sur les tissus de moelle de Tabac. Mais des coupes histologiques révèlent que le parenchyme médullaire cultivé sur un milieu contenant cette fraction, répond par des divisions cellulaires très intenses au niveau des deux ou trois premières assises de cellules. Les cellules néoformées sont beaucoup plus petites que les cellules du tissu initial dont elles remplissent parfois la cavité. Approximativement, elles sont 60 fois plus petites que les cellules du tissu initial.

II. Fractions provenant de l'élution sélective :

Les fractions neutre et acide sont exactement les mêmes que dans le cas de l'élution globale : elles ont la même origine.

La fraction basique, seule, se scinde en deux.

Fraction basique. — Cette fraction basique provient de l'élution ammoniacale du lit d'échangeurs mélangés (1^o du Schéma II).

Elle contient les bases puriques, les bases hexoniques, les acides aminés de pHi basique, et une part des acides aminés se trouvant proches de leur pHi dans la solution traitée (α -alanine, γ -aminobutyrique, proline et valine en particulier).

Cette fraction est active sur la division cellulaire de la moelle de Tabac, et sur l'élongation du mésocotyle.

Fraction amphotère à pHi acide. — Cette fraction correspond aux acides aminés élués avec les acides organiques au moment de l'élution au bicarbonate de l'élution sélective (2^o du Schéma II), puis retenus sur une colonne d'échangeurs acide IR 120. Ces acides aminés comprennent, outre les dicarboxyliques, principalement la sérine, l'asparagine, la glycine, la thréonine, et en commun avec

la fraction basique, l' α -alanine, l'acide γ -aminobutyrique, la proline et la valine.

Elle ne manifeste pas d'activité de division cellulaire importante, ou du moins pas régulièrement décelable. Par contre, elle serait active sur l'élongation cellulaire du mésocotyle d'Avoine, bien qu'il reste un léger doute à ce sujet.

CHAPITRE IV

APERÇU DES TECHNIQUES UTILISÉES PAR DIFFÉRENTS AUTEURS AU COURS DE TENTATIVES DE FRACTIONNEMENT DE LAITS « VÉGÉTAUX » COMPARAISON ET CRITIQUE

Il ne sera question, ici, que des tentatives qui ont pour objet le fractionnement du lait de Coco, de l'albumen laiteux de Marron d'Inde et du lait de Maïs. Ces travaux sont en effet tout à fait comparables à ceux qui viennent d'être exposés.

1. *Tentatives de fractionnement du lait de Coco.*

C'est ce matériel qui a fait l'objet des recherches les plus patientes, surtout de la part de STEWARD et SHANTZ. Toutefois, ils n'ont pas été les tout premiers, ni les seuls, dans leur tentative :

A. *Séparation par solvants organiques.* — Dès 1944, VAN OVERBEEK, SIU et HAAGEN SMIT avaient considérablement concentré l'activité du lait de Coco favorisant le développement des embryons immatures de *Datura* cultivés « in vitro ». A partir d'un précipité à l'acétate de plomb, ils ont remis en solution les substances ainsi séparées du lait de Coco, et ont obtenu un extrait dans l'éthanol à 80% dont l'activité se montra beaucoup plus importante que celle de l'extrait initial. Mais ils n'arrivèrent pas à isoler quoi que ce soit de défini avec cette méthode.

De ROPP, VITUCCI, HUTCHINGS et WILLIAMS essaient en 1952 une séparation du même extrait à l'aide de charbon actif. L'éluat faite avec un mélange méthanol-chloroforme, donne, après évaporation, un résidu solide correspondant à peu près à 1% de l'extrait sec total. Cette fraction provoque un développement des tissus de Carotte beaucoup plus important que l'auxine seule. Toutefois, une activité comparable à celle du lait de Coco entier, ne peut être retrouvée qu'en remettant ensemble filtrat et éluat. DE ROPP (1953) pense que l'activité du lait de Coco est

due à un ensemble de facteurs de nutrition et de croissance déjà connus.

En France, les travaux de PARIS et DUHAMET aboutissent aux mêmes conclusions (1953).

B. *Séparation par précipitation de « complexe métallique »*. — STEWARD et SHANTZ (1954) ne confirment pas ces résultats.

Ces auteurs publiaient dès 1952 des résultats de leur tentative de fractionnement du lait de Coco. Environ 3600 litres de lait de Coco sont traités par un excès d'acétate de mercure. Le précipité formé est filtré, remis en suspension et le complexe mercurique est détruit par H_2S .

Le précipité de sulfure de mercure est éliminé par filtration. Le filtrat est concentré sous vide jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux qui est extrait à l'éthanol à 90%. L'évaporation de l'éthanol laisse un résidu correspondant à 0,6% de l'extrait sec total. Ce résidu actif à 200 ppm, est ensuite fractionné par solubilité différentielle dans des solvants variés, et, par séparation chromatographique, sur colonne de cellulose. Finalement, à l'aide de cette technique SHANTZ et STEWARD obtiennent d'abord trois composés actifs cristallisés A, B, C (1952) et plus tard un quatrième F (STEWARD et SHANTZ, 1954).

En 1955, ils identifient « A » à la 1-3 diphénylurée. Ce corps cependant ne manifeste d'activité sur les tissus de Carotte qu'en présence d'hydrolysate de caséine (1954). B et C se sont montrés très actifs également, mais toujours en présence d'hydrolysate de caséine. A ce jour aucun de ces composés n'a encore été caractérisé.

C. *Fractionnement par échangeurs d'ions*. — Mais les procédés de fractionnement par précipitation mercurique, comme toutes les précipitations par les métaux lourds, ont deux inconvénients majeurs :

— Celui d'introduire un élément toxique, difficile à éliminer parfaitement, et celui d'une action extrêmement brutale au moment de la formation du complexe métallique.

Abandonnant ce procédé, STEWARD et SHANTZ plus récemment ont repris le problème de fractionnement du lait de Coco avec une technique différente. Le lait de Coco est traité par des échangeurs d'ions (STEWARD et SHANTZ, 1958) selon la technique suivante :

Lait de coco $\rightarrow$ Dowex 50 (H^+) $\rightarrow$ Filtrat acide $\rightarrow$ IR 45 (OH^-) $\rightarrow$ Filtrat neutre.

L'échangeur Dowex 50 retient les cations. L'élution se fait par NH_4OH .

— L'éluat de la colonne Amberlite IR 45 est inactif.

— Le filtrat « neutre » traité par du Charbon actif (Darco G. 60) donne deux fractions. L'une, non retenue par le Charbon, appelée *Fraction II*, inactive seule, se montre très active avec la fraction cationique.

L'éluat acétique du Charbon donne une fraction légèrement active à 250 ppm.

2. Tentative de fractionnement d'Albumen laiteux de Marron d'Inde et de Maïs.

A. *Séparation par solvants organiques.* — Ces mêmes auteurs ont également isolé des substances actives du Marron d'Inde et du lait de Maïs immature (1958).

Le procédé de fractionnement est différent de celui utilisé pour le lait de Coco. Pour étudier les substances du Marron d'Inde ils font une extraction éthanolique à 50%. Il se forme un précipité. Après centrifugation, le surnageant est conservé et concentré de moitié. En ajoutant progressivement de l'acétone, différents précipités plus ou moins actifs apparaissent successivement. Ce qui reste en solution est soumis à une extraction automatique liquide/liquide avec du butanol. Une fraction est évaporée et reprise à l'éther, l'insoluble remis en solution est chromatographié sur papier Whatman n° 3 (STEWART et SHANTZ, 1958).

— C'est de cette manière qu'ont été isolés l'acide chlorogénique et des corps analogues aux leucoanthocyanes.

— Du lait de Maïs immature, ils ont isolé, par un procédé semblable, un arabinoside de l'acide indole acétique, ainsi que des bases puriques, mais aucune des substances caractérisées — adénine, adénosine, et uridine — n'a montré d'activité sur le développement du phloème de Carotte.

B. *Séparation par précipitation de complexe métallique.* — A propos du lait de Maïs, la tentative de B. GYORFFI et REDEI doit être citée (1955). Ces auteurs ont essayé eux aussi d'isoler les substances responsables de l'activité du lait de Maïs.

1° Ils coagulent les protéines du lait de Maïs à 100°C. pendant 30 minutes. Le sédiment gélatineux formé est éliminé par centrifugation ;

2° Après concentration sous vide du surnageant, ils y ajoutent de l'éthanol à 96°. Il se forme un précipité qu'ils éliminent ;

3° Le surnageant est de nouveau concentré et ensuite traité trois fois à l'éther dépéroxydé ;

4° La phase aqueuse, débarrassée de l'éther, est amenée à pH 8, et ils obtiennent un précipité de complexe mercurique en

ajoutant de l'acétate de mercure. Après avoir ajouté 2 volumes d'éthanol à 80%, ils centrifugent. Le culot de centrifugation est repris, lavé à l'éthanol, mis en suspension dans l'eau et décomposé par H_2S .

— Le liquide surnageant évaporé laisse un résidu (appelé précipité de NEUBERG-KERB, 1912). Ce précipité est ensuite remis en solution aqueuse et traité au butanol et à l'éther.

— Ils ont également essayé un fractionnement par extraction au butanol et à l'éthanol.

— Ils pensent que c'est aux acides aminés et aux auxines qu'il contient, que doit être attribuée l'activité du lait de Maïs.

Observations

Au cours de leurs recherches sur le lait de Coco, SHANTZ et STEWARD ont abandonné les précipitations métalliques, sans doute parce que ce procédé ne leur a pas permis d'atteindre les résultats qu'ils espéraient. La technique d'échangeurs qu'ils utilisent ensuite est tout à fait analogue dans son principe à celle qui a permis dans la présente recherche de fractionner le lait de Maïs, d'abord en deux groupes (BEAUCHESNE et NETIEN, 1952), puis en trois groupes de substances actives : acide, basique et neutre (BEAUCHESNE, 1957).

La technique utilisant les échangeurs d'ions est certainement préférable à celles qui emploient les précipitations de complexes de métaux lourds. Cependant, il est permis de considérer que, même si les résultats obtenus sont satisfaisants, avec la technique usant d'échangeurs d'ions séparés, l'emploi d'échangeurs mélangés semble préférable parce que moins brutal.

Dans leur tentative de fractionnement du lait de Maïs, GYORFFY, REDEI et Mme REDEI ont éliminé les protéines par un traitement à 100°C. pendant 30 minutes. L'extrait ainsi traité risque de perdre une part de son activité, du moins d'après les expériences rapportées ici (*cf.* Première Partie, Chapitre IV, *effets de la chaleur*). Ils usent également des précipitations mercuriques que SHANTZ et STEWARD semblent avoir abandonnées comme peu satisfaisantes.

Les séparations par solubilités différentielles dans les solvants organiques ont été employées, apparemment avec succès, pour l'isolement des substances actives du lait de Maïs et du Marron d'Inde (SHANTZ et STEWARD, 1958). GYORFFY et REDEI (1955) emploient également des solvants organiques pour l'extraction des auxines du lait de Maïs.

Il est permis d'avouer une certaine réticence devant ces techniques qui n'ont pas en apparence la brutalité des précipitations métalliques, ni même peut-être celles des échangeurs séparés.

Les solvants purs peuvent être aussi néfastes que la chaleur ou les changements sévères de pH, lorsqu'il s'agit de complexes biologiques. Ceci n'est encore qu'une question posée dans le cas des extractions de substances de croissance, et il faudra encore attendre quelque temps avant qu'elle ne trouve sa réponse.

Les échangeurs à degré de divinylbenzène standard (8 à 10%) sont déjà des filtres qui éliminent les grosses molécules. Celles-ci en effet, ne peuvent pénétrer dans les mailles de tels échangeurs. Si, de plus, les échangeurs acides et basiques sont mélangés et que, de ce fait, il n'y a plus à craindre de changement de pH, les garanties biologiques pourraient être meilleures qu'avec n'importe quelle autre technique de fractionnement.

Les molécules éluées des échangeurs mélangés peuvent ensuite être soit réadsorbées sur des échangeurs, soit traitées par des solvants organiques purs, puisque les complexes les plus fragiles ont été éliminés.

Toutefois, même dans la perspective de fractionnement d'un groupe de substances relativement simples, l'usage des solvants organiques, dans les séparations par solubilité différentielle, ne semble pas être toujours le moyen le plus efficace d'aboutir parce que souvent pas assez spécifique, au moins dans les cas envisagés.

Lorsque les techniques de purification d'une substance active de la fraction cationique du lait de Maïs auront été exposées dans les prochains chapitres, il sera temps de considérer ce que les auteurs, dont il vient d'être question, ont fait dans ce domaine.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA FRACTION NEUTRE ET DE LA FRACTION BASIQUE DU LAIT DE MAIS

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DE LA FRACTION NEUTRE

L'étude de la fraction neutre du lait de Mais a simplement été abordée (BEAUCHESNE, 1959), (BEAUCHESNE et JOUANNEAU, 1960). Seuls, les premiers résultats de cette investigation sont brièvement exposés ici. La fraction neutre active sur le développement des tissus de Topinambour (Tableau XII), l'est aussi et plus nettement encore, sur le développement des tissus de moelle de Tabac, même en l'absence d'auxine (Pl. I, fig. 1). Voici, par exemple, un résultat caractéristique :

— La croissance des tissus de moelle de Tabac cultivés en présence de 2 ppm d'AIA exprimée en poids de substance fraîche (P.F.) atteint 1,6 g après 40 jours. Sur un milieu contenant de la fraction neutre à la concentration de 10%, le poids du même tissu atteint dans le même temps 130 g. Si cette croissance est mesurée en poids de substance sèche (P.S.) les différences sont moindres, soit par gramme de substance *fraîche*, 58 mg dans le cas des cultures en présence d'auxine seule et 120 mg dans le cas des cultures en présence de la fraction neutre. La croissance du tissu de moelle de Tabac sur le mélange « AIA + fraction neutre » dans la même expérience, mesurée en poids de substance fraîche a été de 183 g mais seulement de 111 mg de substance sèche, par gramme de substance fraîche.

Dans l'un et l'autre cas, le tissu est ferme et les cultures régulières. Cette fraction agit très rapidement sur les cultures de moelle de Tabac, mais assez irrégulièrement sur les cultures de tissus de Topinambour.

Ce groupe étant absolument « désionisé », et de ce fait ne contenant plus ni acides, ni bases, ni sels, ni esters (BEAUCHESNE

et JOUANNEAU, 1960), a été soumis à une dialyse prolongée dans deux conditions différentes : 1^o contre de l'eau distillée, et 2^o contre de l'alcool à 50%. La membrane de dialyse est constituée par du boyau cellulosique Viscora SS 65. Ces opérations sont menées en chambre froide entre 0°C et -3°C. L'agitation du milieu est assurée par un agitateur magnétique. Pour chaque dialyse, 100 ml de solution alcoolique de la fraction neutre concentrée 10 fois ont été traités contre 8 fois 2000 ml. Cette fraction neutre provenait d'un lait de Maïs traité par échangeurs séparés.

1. Dialyse contre H_2O

Au cours de la dialyse contre de l'eau, par suite d'un phénomène de pression osmotique, l'eau traverse la membrane de dialyse au point de tripler le volume de liquide initialement mis à dialyser. Ce liquide se trouble et à la longue un précipité se dépose.

Le dialysat a montré une très grande activité sur les cultures de moelle de Tabac, analogue à l'activité de la fraction neutre entière. L'adialysable a lui-même manifesté une activité de division cellulaire nette surtout en présence d'auxine (Pl. I, fig. 2).

Une chromatographie ascendante du dialysat a été faite dans le solvant isopropanol/eau. Le chromatogramme a été découpé en 20 sections de 10 mm, et chaque section a été essayée sur le test mésocotyle d'avoine, selon la technique de NIRSCH (1956). Une zone active est décelée au RF 0,80. Mais aucune réaction colorée n'a été obtenue. Cette activité d'élongation cellulaire apparaissant sur les chromatogrammes dans une zone où se situe habituellement les substances auxiniques neutres, pouvait être due à des substances qui auraient traversé les colonnes d'échangeurs saturés plus vite qu'il n'était prévisible.

Si cette hypothèse était exacte, cette zone d'activité devrait être éliminée en traitant le dialysat par un échangeur exceptionnellement fort : Dowex 21 K. Le résultat de ce traitement est qu'une partie des sucres réducteurs a été fixée par l'échangeur, mais, dans le filtrat, la même substance a été décelée, après chromatographie au même Rf., par son activité d'élongation cellulaire. Il ne peut donc être question d'un ester de l'acide indolacétique qui aurait pu se trouver dans la même région du chromatogramme ; les échangeurs utilisés scindent de tels corps en leurs constituants (cf. BEAUCHESNE et JOUANNEAU, 1960). L'adialysable n'a pas montré d'activité sur le test mésocotyle d'Avoine dans cette expérience. Cet adialysable, résidu de la dialyse aqueuse, a été, en une seconde opération, dialysé contre de l'alcool à 50%.

a) La pression osmotique, manifestée dans l'eau, disparaît dans l'alcool à 50%, et le sac retrouve son volume initial, ce qui n'a rien que de normal.

b) Le trouble disparaît également et les substances précipitées sont presque totalement remises en solution.

Une chromatographie de ce dialysat alcoolique dans l'isopropanol - eau fait apparaître une zone active, décelée avec le test mésocotyle d'avoine, comme dans le cas précédent. L'adialysable, résidu de la dialyse aqueuse, n'avait cependant manifesté aucune activité d'élongation.

2. Dialyse contre de l'éthanol à 50%.

Une dialyse uniquement faite contre de l'alcool à 50% donne les mêmes résultats que la dialyse faite contre de l'eau. Toutefois, des substances qui seraient solubles dans l'alcool à 50% et ne le seraient que peu ou pas dans l'eau, dialysent plus rapidement. La purification de l'adialysable est meilleure.

Le dialysat évaporé a laissé environ 100 mg de matière qui n'a pu être desséché parfaitement, sans doute à cause de la présence de substances lipidiques abondantes.

L'adialysable a laissé 920 mg de substance sèche.

La dialyse ne s'est pas montrée suffisante pour une analyse systématique de la Fraction neutre. Elle a été abandonnée au profit d'autres techniques permettant une séparation plus spécifique des substances actives que cette fraction contient. Les résultats obtenus sont encore trop partiels pour qu'il soit possible d'en parler plus longuement. Seule, l'étude de la fraction cationique a été poursuivie jusqu'à isolement d'une substance active présentant des critères de pureté suffisants.

CHAPITRE II

FRACTIONNEMENT DE L'ÉLUAT CATIONIQUE DU LAIT DE MAÏS

Dans cette fraction ont été décelés une vingtaine d'acides aminés dont la plupart ont été identifiés (cf. II^e partie, chapitre I-II). Les cultures de tissus de Topinambour prolifèrent beaucoup plus sur les milieux contenant cette fraction que sur les autres, ou qu'en présence d'auxine seule. La présence des acides aminés ou de quelques polypeptides de faible poids moléculaire, ou d'autres

substances à caractère basique, pouvaient être cause de cette activité (NETIEN et BEAUCHESNE, 1954).

Il a été dit au chapitre II de la seconde partie de ce mémoire, que les cultures de tissus de Topinambour, faites sur un milieu synthétique représentant très incomplètement la fraction cationique du lait de Maïs, n'avaient pas proliféré.

A ce propos, ont été cités des travaux de SHANTZ et STEWARD (1952) et de NITSCH et C. NITSCH (1957) dont les conclusions ne permettent pas d'attribuer à des mélanges définis, ou mal définis, d'acides aminés, comme l'hydrolysât de caséine, une activité sur la croissance autre que celle d'un aliment. En aucun cas, les croisances obtenues par ces auteurs ne sont comparables à celles des tissus de Topinambour cultivés sur la fraction basique du lait de Maïs.

Ces données ne permettent cependant pas de préciser le rôle des acides aminés apportés par le lait de Maïs, et ce problème demeurerait donc posé. Pour savoir si l'activité de croissance provoquée par la fraction cationique devait être attribuée à l'ensemble des acides aminés ou simplement à quelques-uns d'entre eux, ou même à des substances inconnues présentes dans ce mélange, il fallait tenter une séparation de ces corps.

Après divers essais de fractionnement au moyen de solvants organiques qui ne donnèrent aucun résultat, c'est d'abord l'électrophorèse qui a été utilisée, et ensuite les échangeurs d'ions basiques forts.

1. Fractionnement des cations organiques du lait de Maïs par électrophorèse.

A. Précisions techniques. — L'électrophorèse-type a d'abord été appliquée aux grosses molécules protidiques. Cette électrophorèse se fait en milieu liquide, selon le principe de TISELIUS.

Lorsqu'il s'agit d'électrophorèse appliquée aux petites molécules, certains auteurs préférèrent parler de « ionophorèse ». Cette technique et ses développements ont fait l'objet de nombreuses publications. BLOCK, DURRUM et ZWEIG (1955) et BIER (1959) sont les principaux auteurs qui ont été consultés au cours de ce travail.

a) L'électrophorèse plane sur papier a été utilisée à deux fins : soit comme méthode d'analyse des constituants de certaines fractions, soit — mais uniquement à la fin de cette recherche — comme méthode de purification.

Dans le premier cas, la tension utilisée est comprise entre 300 et 800 volts, et l'intensité entre 15 et 20 mA. Dans le second

cas, la tension ne descend jamais au dessous de 800 V, et l'intensité est de 40 mA. (cf. III^e Partie, chap. III).

Mais c'est surtout dans le but de faire des analyses rapides que l'électrophorèse plane sur papier a été utilisée.

Les substances séparées de cette manière sont mises en évidence à l'aide de réactifs appropriés.

b) L'électrophorèse continue a été utilisée dans le but de séparer les constituants de la fraction basique du lait de Maïs. Elle est plus délicate que la précédente, car elle s'apparente en même temps à la chromatographie.

Il ne semble pas utile de s'étendre sur cette technique en détail. Aucun appareil actuellement sur le marché n'est satisfaisant.

Certains points sont cependant à signaler.

Il est important que l'écoulement du tampon se fasse d'une manière identique dans les électrodes et sur le rideau de papier qui sert de support à l'électrophorèse.

Il est important également que la solution à séparer arrive avec un débit constant sur le papier. Le système employant une mèche de papier pour établir le contact entre le récipient contenant le liquide à analyser et le papier, est insuffisant, surtout pour des électrophorèses de longue durée. Le système qui a été utilisé avec le meilleur résultat, est constitué par un fin capillaire en verre qui conduit la solution à analyser d'un réservoir à pression constante au contact du rideau de papier.

Enfin, l'appareil utilisé ne permettait pas, tel qu'il avait été conçu par les constructeurs, de recueillir les fractions séparées sans arrêter l'électrophorèse en cours.

— Une modification qui a consisté à percer la base de l'appareil pour relier de petits erlenmeyers de 100 ml aux tubes collecteurs dont le fond avait été percé, a permis de remédier à ce défaut.

Au cours de ces électrophorèses, le tampon est toujours le même : Pyridine/Acétique (d'après MICHL, 1951, cité par BISERTE, 1960). Le papier est le Whatman n° 3MM. Dans le cas de l'électrophorèse continue la tension utilisée est de 400 V. sous 18 mA.

B. *Résultats*. — Dans les conditions définies ci-dessus, 2 litres d'un éluat cationique sont soumis à l'électrophorèse continue. Les fractions au nombre de 28, sont régulièrement recueillies et analysées par électrophorèse simple. Ce nombre a été réduit à 7 seulement, en mettant ensemble les fractions qui possèdent en commun une ou plusieurs substances. Cette séparation relativement grossière de 2 litres de la fraction cationique du lait de Maïs fut terminée en 1 mois.

L'action de chacune des fractions ainsi obtenues est étudiée à l'aide de cultures de tissus de moelle de Tabac. Le développement

de ces tissus en présence des fractions les plus électropositives, révèle que l'activité s'est déplacée avec ce groupe de substances (Pl. VI, fig. 15). L'aspect des tissus très fermes, les cals importants, manifestent qu'il s'agit d'une activité de division cellulaire. Il est à noter que le développement des cals formés est beaucoup plus considérable qu'en présence de la fraction cationique totale (Pl. V, fig. 12). Dans ces fractions actives, la plupart des acides aminés se trouvent éliminés. Il ne reste que les plus basiques d'entre eux.

Dans la fraction active, le bleu de bromophénol acétonique-nitrate d'argent (v/v), réactif des bases puriques, révèle la présence de plusieurs substances donnant la réaction de ces corps (1).

Si, comme l'indique les résultats obtenus en appliquant l'électrophorèse continue, l'activité de la fraction cationique du lait de Maïs est liée aux substances les plus basiques, les échangeurs basiques forts pourraient remplacer avantageusement, dans cette étape de purification, l'électrophorèse continue trop longue et toujours délicate. Ces échangeurs retiennent en effet tous les amphotères par leur groupement acide, et ne laissent passer que les substances basiques.

2. Fractionnement des cations organiques du lait de Maïs par échangeurs basiques forts comparaison avec les fractions actives de l'électrophorèse.

La fraction cationique du lait de Maïs, toujours en milieu alcoolique à 50%, est versée sur une colonne d'échangeurs anioniques forts Dowex 2. L'échangeur est préparé par de la soude à 4% et rincé jusqu'à neutralité selon la technique habituelle. Tous les acides aminés sont retenus, sauf les plus basiques. Dans le filtrat, sont retrouvées plusieurs substances donnant des réactions positives à la ninhydrine et des substances donnant des réactions positives au bleu de bromophénol en présence de nitrate d'argent (purine ou pyrimidine). Une chromatographie bidimensionnelle de ce filtrat a été faite, et il y apparaît nettement que seules les sub-

(1) *Réactif Nitrate d'argent + Bromophénol bleu.* — Ce réactif est ainsi constitué : AgNO_3 2% dans H_2O + bromophénol bleu 0,4% dans l'acétone. Il faut mélanger volume à volume immédiatement avant l'emploi. La bande à révéler est trempée une ou deux minutes dans ce mélange, et laissée à l'air une dizaine de minutes. Au moment, où la feuille est trempée dans le mélange, il est possible, avec une certaine habitude, de déceler les bandes correspondant aux purines qui donnent généralement une coloration gris noir sur fond jaune. D'autres corps comme les acides aminés, donnent aussi des bandes colorées, mais elles disparaissent au lavage, et les bandes de purines apparaissent alors en bleu. Le lavage doit être fait avec le moins d'eau possible à la fois et lentement.

stances basiques ont traversé la colonne d'échangeurs avec des traces importantes d'une substance située à la place de l' α -alanine.

Ce filtrat stimule vivement la division cellulaire de la moelle de Tabac, d'une manière tout à fait semblable à celle des fractions actives provenant de l'électrophorèse continue (Pl. VI, fig. 16).

TABLEAU XIV

Action comparée de la fraction cationique purifiée par électrophorèse et de la fraction purifiée par échangeurs basiques forts Dowex 2, sur le développement de cultures de tissus de moelle de Tabac (W. 38).

	Coefficient d'accroissement absolu	Coefficient d'accroissement relatif
Témoin sans AIA	1,23	1
Témoin + AIA 2 ppm.....	3,16	2,5
Fraction I d'électro. + AIA 2 ppm.....	16,36	13,3
Fraction II d'électro + AIA 2 ppm.....	16,92	13,7
Filtrat basique (Dowex 2) + AIA 2 ppm.....	25,00	20,3

Le tableau XIV permet de comparer l'activité des fractions purifiées soit par la technique d'électrophorèse continue, soit par la technique d'échangeurs basiques forts.

Les fractions I et II d'électrophorèse continue indiquées dans ce tableau, correspondent aux deux fractions les plus électropositives obtenues avec cette technique. L'analyse, par électrophorèse plane, révèle qu'elles contiennent l'une et l'autre, au milieu d'autres substances différentes, une purine, qui serait la même d'après ses déplacements à pH 3,9.

Les autres fractions ont été également essayées, sur les cultures de moelle de Tabac, sans résultats positifs.

Toutes les fractions ont été essayées avec et sans auxine. Les fractions actives n'ont manifesté leur activité qu'en présence d'auxine. De même, les substances retenues par l'échangeur Dowex 2 ont été essayées dans les mêmes conditions que le filtrat basique, avec et sans auxine. Seul le filtrat basique s'est montré actif et uniquement en présence d'auxine. Ce filtrat contient également une purine, qui pourrait être la même que celle des fractions I et II, d'après ses déplacements en électrophorèse plane.

Le fait que la substance active traverse la colonne d'échangeurs prouve qu'il s'agit d'une substance basique ne présentant probablement pas les caractères amphotères des acides aminés neutres ou acides.

Il n'a pas paru essentiel de rapporter les résultats des cultures sans auxine, ni ceux des fractions inactives, tout à fait semblables à ceux des témoins.

CHAPITRE III

PURIFICATION DE LA FRACTION ACTIVE SÉPARÉE DE LA FRACTION CATIONIQUE DU LAIT DE MAÏS

Dès qu'il fut suffisamment établi au moyen des cultures de tissus que l'activité de la fraction cationique du lait de Maïs se retrouvait dans le filtrat basique des échangeurs d'anions forts, des essais de purification plus poussée furent entrepris. Pour cette fraction débarrassée déjà de la plupart des amphotères, l'électrophorèse semblait encore la technique la plus convenable pour une purification finale. Un essai avec l'appareil à électrophorèse continue utilisé antérieurement ayant dû être interrompu, et les appareils commerciaux courants ne permettant pas d'utiliser les mélanges tampons, tel que celui utilisé au cours de ces recherches (pyridine/acétique), cette technique a été abandonnée bien qu'elle semble être le moyen le plus rapide et le plus efficace pour une telle purification.

La mise au point d'une technique d'électrophorèse plane permettant le traitement de quantités suffisantes de la fraction à purifier, pour que puissent être faits des essais biologiques avec les nouvelles fractions obtenues, a été tentée.

1. Essai de purification par électrophorèse sur papier.

Trois feuilles de papier Whatman n° 3MM qui ont été au préalable imprégnées de tampon (pyridine/acétique, pH 3,9) et essorées avec du papier filtre, sont placées sur une plaque de plastique en chlorure de polyvinyl rigide, de 38 cm de large sur 42 cm de long.

Des feuilles de papier Whatman n° 1 placées aux extrémités de la plaque servent de ponts entre les bacs à électrodes et les

3 feuilles de papier. Une adhérence parfaite de ces trois feuilles est assurée par un bac à glace de même dimension qui presse fortement l'ensemble.

Une tranchée de 2 mm de large est découpée dans l'épaisseur de 3 feuilles à l'aide d'une lame de rasoir, à 10 cm du bord vers l'anode.

La substance à purifier, diluée dans 1 ml de tampon, est introduite sous forme de pâte d'amidon dans la tranchée ainsi préparée.

Une quantité de substance correspondant à environ 200 ml de lait de Maïs initial peut être ainsi soumise à l'électrophorèse. Une fine membrane de plastique recouvre l'ensemble et l'isole du bac à glace. La tension aux bornes est de 800 V. sous une intensité de 40 mA. L'électrophorèse est maintenue 3 heures. Après quoi, les trois feuilles de papier sont séchées dans une étuve à 40° C. Une bande large de 2 cm est découpée au milieu de chacune d'elles dans le sens de la longueur, pour y déceler l'emplacement des substances à l'aide de réactions à la ninhydrine ou au nitrate d'argent/bleu de bromophénol.

Les bandes révélées, les feuilles sont découpées non pas à intervalles réguliers, mais en autant de zones que de substances apparues sur les bandes révélées, soit sept dans le cas présent. Deux bandes témoins sont également découpées, l'une prise sur 5 cm au départ, l'autre sur 5 cm au-delà de la dernière bande. Les bandes sont éluées par de l'alcool à 50% et l'éluat évaporé. Parfois, elles sont introduites directement dans le milieu de culture.

Cette technique a permis d'établir qu'en électrophorèse plane, la substance active se déplaçait peu, contrairement aux autres corps de la même fraction. Les bandes découpées, introduites dans les milieux de culture, indiquèrent que l'activité se trouvait située, dans le cas considéré, à 7 cm environ de la rigole de départ.

Dans cette zone active, le bleu de bromophénol-nitrate d'argent révèle la présence d'une substance donnant les réactions des bases puriques. Un autre réactif de ces corps (nitrate mercurique en solution nitrique) (1) confirme ces indications.

Il s'est révélé très vite que cette technique était assez irrégulière dans ses résultats, sans doute à cause de la difficulté qu'il y a d'essorer d'une manière homogène chaque feuille. D'autre part, il n'était pas possible d'obtenir de cette manière des quantités suffisantes de substances purifiées.

(1) *Réactif mercurique.* — Une autre technique consiste à tremper la bande de papier séchée et lavée à l'éther, dans une solution de nitrate mercurique à 0,25 M, dans une solution nitrique à 0,05 N, et finalement à la rincer dans l'eau. Puis la feuille est révélée au gaz H_2S : les complexes mercurique-purine apparaissent en noir. Le rinçage est très important : sans cela, les traces de Hg^{++} réagissent avec H_2S et noircissent toute la feuille.

2. Essais de purification sur amidon de Pomme de terre

L'électrophorèse sur amidon de Pomme de terre convient mieux à cette purification quantitative recherchée, et est beaucoup plus régulière. La technique exposée ici a été mise au point au cours de ce travail, mais de nombreux auteurs emploient depuis longtemps l'amidon comme support dans l'électrophorèse (KUNKEL, 1952, CARLSON, 1954, MORETTI, BOUSSIER et JAYLE, 1957 et 1958, BLOEMENDAL, 1959-1960 a et b). Toutefois, il n'est pas courant d'utiliser l'amidon comme support d'électrophorèse pour séparer des corps organiques de faible poids moléculaire, car il est fréquent dans ce cas de perdre, dans ce support, des quantités appréciables de substances. Cependant, en attendant d'avoir mis au point une technique avec de la poudre très fine de chlorure de polyvinyl, l'amidon a été utilisé avec d'assez bons résultats. L'amidon doit être lavé jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'absorption entre 210 et 400 m μ . Il ne suffit pas de le laver à l'eau, ni même à l'alcool à 50%, mais il est nécessaire de le traiter à l'alcool à 98%.

Voici la technique de lavage utilisée pour 1 kg d'amidon de Pomme de terre - Prolabo :

1° Dans un bécher de 3 litres, 1 kg d'amidon est versé dans 2 litres d'eau en agitant. Après avoir laissé reposer de 15 à 30 minutes, l'eau est décantée. L'opération est répétée deux fois. Enfin, agitée de nouveau avec 1 litre d'eau, la suspension est versée sur un entonnoir de Büchner au-dessus d'une grande fiole à vide. Une trompe à eau crée une légère dépression dans la fiole pour accélérer le passage de l'eau. Il faut encore faire passer sur l'amidon environ 5 ou 6 litres d'eau, jusqu'à ce que l'eau prélevée à la sortie de l'entonnoir de Büchner ne présente plus d'absorption entre 210 et 400 m μ .

2° L'amidon est remis dans le bécher de 3 litres en présence de 2 litres d'alcool à 50%, mélangé et versé de nouveau sur Büchner. L'amidon est lavé avec environ 5 ou 6 litres d'alcool à 50%, jusqu'à ce que le liquide prélevé au bas de l'entonnoir ne présente plus d'absorption entre 210 et 400 m μ .

3° Enfin, en opérant de la même manière, il faudra encore autant d'alcool distillé à 98% pour ôter toute trace de substance absorbante entre 210-400 m μ . Pour la fécule « Bender » les lavages sont beaucoup plus réduits, car cet amidon est déjà très purifié. La fécule Prolabo ne l'est pas du tout.

Cet amidon ainsi lavé, débarrassé de toute substance soluble dans l'eau ou l'alcool, est séché à l'étuve à 50°C pendant toute une nuit.

Pour un « gâteau » de 36 cm de large, 50 cm de long et 2 mm d'épaisseur, il faut 350 g d'amidon sec. Dans un bécher d'un litre, l'amidon est mélangé avec 450 ml de tampon pyridine-acétique (12 : 40/3 l). Décanter, et ajouter un volume de tampon égal à celui de la fois précédente. Laisser en chambre froide, et décanter au moment de s'en servir.

L'appareil où se fait l'électrophorèse est très simple (Pl. VI, fig. 17, 18 et 19) : deux plaques de chlorure de polyvinyl rigide (Afcodur ou Leucoflex) séparées par un cadre de caoutchouc de 2 mm d'épaisseur qui délimite, entre elles deux, une cellule de 50 cm $\times$ 36 cm $\times$ 2 mm, sont serrées très fortement l'une contre l'autre. Le serrage est assuré par trois séries de mâchoires métalliques de 45 cm réparties l'une au milieu, les deux autres chacune à 10 cm des extrémités et vissées.

La plaque supérieure enlevée, l'amidon, qui doit avoir une consistance légèrement pâteuse, est versé au milieu de la surface délimitée par le cadre de caoutchouc en place sur la plaque inférieure. Auparavant, des bandes de papier Whatman n° 1 qui serviront de ponts entre l'amidon et les électrodes ont été placées aux extrémités. Ces bandes coincées sous le cadre de caoutchouc s'étalent sur 5 cm vers le milieu de la plaque et sur toute la largeur. Il est bon d'humidifier ces bandes de papier avec le tampon afin qu'elles adhèrent bien à la plaque et que l'amidon ne s'introduise pas au-dessous. Il faut cependant éviter de mouiller trop abondamment car l'extrémité extérieure de ces bandes, devenant ainsi fragile, risque de se déchirer au cours des manipulations suivantes.

La pâte d'amidon bien homogène se répand sur toute la surface qui doit être parfaitement horizontale. Si c'est nécessaire, il faut avec une spatule aider à l'étalement. Laisser reposer quelques minutes, puis essorer avec du papier filtre jusqu'à ce que le gâteau d'amidon ait une consistance dure. Alors est creusée dans le sens de la largeur, une rigole de 2 mm de large sur 32 cm de long, du côté de l'anode, à 10 ou 12 cm du bord. Dans cette rigole, à l'aide d'une fine spatule est introduite la fraction à purifier qui a été évaporée à sec, reprise dans 1 ml de tampon et amenée à consistance pâteuse par de l'amidon sec.

Le gâteau ainsi préparé est recouvert. Il est nécessaire d'intercaler une fine membrane de polyéthylène entre le gâteau et la plaque supérieure pour empêcher que l'amidon n'y adhère. Le tout, serré entre les mâchoires métalliques, est placé avec les bacs à électrodes dans de la glace. Une petite enceinte de polystyrène expansé de 5 cm d'épaisseur assure l'isolation thermique. L'électrophorèse est faite entre 1000-1100 V. et 60-70 mA pendant 6 à 8 heures. La température se maintient entre 4 et 6°C. Après

quoi la plaque supérieure étant enlevée, ainsi que la membrane de plastique, les zones d'emplacement des substances sont révélées :

a) *Par fluorescence aux U.V.* : Le gâteau d'amidon sur la plaque est transporté sous une lampe à U.V. La fraction provenant du filtrat basique de la résine Dowex 2 possède 2 bandes fluorescentes assez proches l'une de l'autre vers la ligne d'insertion de la substance à purifier.

b) *A l'aide de réaction à la ninhydrine, et au bleu de bromophénol argentique* : Le gâteau d'amidon étant essoré au maximum au moment de sa préparation, ne laisse aucune trace d'humidité sur les bandes de papier qu'on y applique. Il n'est pas possible d'obtenir, de cette manière, de transfert de substances de l'amidon sur le papier. Il faut donc procéder de la manière suivante :

Une bande de papier Whatman n° 3MM large de 10 cm est trempée dans une solution de tampon pyridine-acétique, et, sans avoir été essorée, est appliquée sur le gâteau d'amidon. L'amidon absorbe l'excès d'humidité. Après quelques secondes, sur la bande de papier collée à l'amidon, est appliquée une autre bande de papier Whatman, mais cette fois absolument sèche.

Elle essore la précédente et de cette manière l'amidon cède de l'humidité absorbée et, avec elle, des traces de substances. La feuille qui a été appliquée directement sur l'amidon est séchée et coupée en deux dans le sens de la longueur; une bande sera révélée à la ninhydrine, l'autre sera révélée au réactif bleu de bromophénol argentique.

Aussitôt, après avoir ainsi localisé les substances séparées, le gâteau d'amidon est découpé en autant de zone. Chaque zone est mise dans un bécher en présence d'éthanol à 50%, en vue de l'élution.

Pour éluer, le procédé suivant est utilisé :

Des fioles d'Erlenmeyer d'un litre surmontées chacune d'un entonnoir avec un filtre sont préparées en nombre égal aux « zones » à éluer. L'amidon à éluer est agité avec de l'éthanol à 50% et laissé reposer. Puis le liquide surnageant est versé sur le filtre. L'élution est suivie au spectrophotomètre Beckman DK2. La pyridine donne une très forte absorption dans l'U.V. C'est cette substance qui sert d'indicateur de fin d'élution lorsqu'elle n'est plus décelable dans les éluats. L'élution de l'amidon est lente. Il faut parfois plus d'un litre d'éluat pour quelques grammes d'amidon. Il semble que, de cette manière, assez peu de substance soit perdue en restant adsorbée sur l'amidon.

3. Résultats.

a) *Caractérisation chimique de la substance isolée.* — Les électrophorèses précédentes sur papier, ayant montré que la zone active comprenait toujours une substance donnant les réactions des purines et une absorption dans l'U.V. avec un maximum aux environs de 260 m μ et un minimum aux environs de 235-240 m μ , seules les fractions caractérisées de cette manière ont été étudiées. Une seule zone correspond à ces déterminations, une substance unique d'après l'électrophorèse semble s'y trouver. Un essai de purification plus poussée à l'éther n'a pas donné de résultats significatifs. A différents pH, les données suivantes sont obtenues dans l'ultra-violet entre 340 m μ et 220 m μ .

D'une part, sont marqués les maximums et minimums caractéristiques du spectre, et d'autre part, les rapports d'absorptions à certaines longueurs d'ondes permettant de se rendre compte de l'importance des dissociations moléculaires s'il en existe, à différents pH.

<i>maximums et minimums</i>	<i>Rapports d'absorption</i>
à pH 7 = max. 158—259 m μ min. 229 —230 m μ	$\frac{250}{260} = 0,83$
	$\frac{280}{260} = 0,40$
	$\frac{250}{260} = 0,88$
	$\frac{280}{260} = 0,37$
à pH 2 = max. 256 m μ min. 233 m μ	$\frac{250}{260} = 0,85$
	$\frac{280}{260} = 0,30$
	$\frac{250}{260} = 0,85$
	$\frac{280}{260} = 0,30$

Le peu de changement enregistré dans les minimums et maximums et les faibles variations entre les rapports $\frac{250}{260}$ et $\frac{280}{260}$ indiquent que cette substance, quoique se comportant comme une base organique, ne subit que peu de modifications moléculaires, au cours des variations de pH.

Ce spectre ne correspond à celui d'aucune base purique connue bien qu'il soit proche de celui de l'adénine (MARKHAM, in « Peach et Tracey », IV, 1955).

Ce serait probablement une substance parente de ce corps. Aucune caractérisation chimique précise de la substance isolée n'a été faite ; elle est obtenue en quantité trop faible encore au moment où ce mémoire s'achève. Cependant, les techniques étant au point et les fractionnements se poursuivant, des quantités suffisantes pourraient être obtenues pour qu'une analyse chimique puisse être faite par des spécialistes.

En résumant ce qui a été acquis, cette substance :

- a) traverse les membranes de dialyse ;
- b) se comporte comme une base vis-à-vis des échangeurs d'ions ;
- c) en électrophorèse continue, se retrouve dans les fractions plus électro-positives ;
- d) n'est pas fixée par les échangeurs forts d'anions, type Dowex 2, au contraire des amphotères ;
- e) est soluble dans l'éthanol à 90% ;
- f) est insoluble dans l'éther ;
- g) en électrophorèse plane, elle se déplace peu à pH 3,9 par rapport aux bases organiques ;
- h) elle donne, avec les réactifs des purines, les réactions caractéristiques de ces corps ;
- i) en U.V. son spectre d'absorption est caractéristique des purines : et en particulier très proche de celui de l'adénine ;
- j) comme l'adénine et ses composés, cette substance est longue à éluer des échangeurs qui l'ont fixés, bien qu'elle commence à apparaître dans les premières fractions de l'élution.

Il est possible d'affirmer que cette substance est très voisine des bases qui entrent dans la composition des acides nucléiques, ce qui pourrait expliquer le fait qu'elle favorise la division cellulaire de tissus tels que ceux de la moelle de Tabac, incapables par eux-mêmes d'entrer en division cellulaire. L'adénine n'a aucune action sur ces tissus.

b) *Action physiologique caractéristique.* — Avec le tissu de moelle de Tabac ont été obtenus non seulement des cals très volumineux, mais également des bourgeons (Pl. VIII, fig. 20 et 21), aussi bien à partir des fractions actives, produits de l'électrophorèse continue, qu'à partir des fractions traitées par échangeurs d'ions (Filtrat Dowex 2).

De nombreuses études ont été faites sur l'action des hydrolysats d'acides nucléiques, et particulièrement de leurs constituants basiques. Sauf la kinétine isolée par MILLER et collab. (1955), aucune de ces bases ne s'est montrée active sur la division cellu-

laire de tissu semblable à la moelle de Tabac. Les expériences de LINGAPPA (1957) montrant une action favorable de l'adénine et de l'adénosine sur le développement des tissus de Pomme de terre, ne sont pas probantes. Cet auteur utilise un milieu contenant du lait de Coco et de l'acide naphthalène acétique. SHANTZ (1955) avait déjà montré l'action favorable du lait de Coco sur le tissu de Pomme de terre en présence de substances synthétiques, (2,4-D en particulier).

Les bases puriques ou leurs composés isolés du lait de Coco ou du lait de Maïs, par SHANTZ et STEWARD, sont sans activité sur les cultures de phloème de Carotte (1958).

Les effets morphogènes sur la moelle de Tabac ne sont pas du tout comparables à ceux de l'adénine. Les bases des acides nucléiques ne provoquent aucune prolifération de la moelle de Tabac. Or, sur la moelle de Tabac, il n'apparaît jamais de bourgeons sans qu'auparavant elle n'entre en division.

La substance purifiée par électrophorèse plane provoque les mêmes phénomènes morphologiques. Ces bourgeons repiqués d'abord dans des erlenmeyers sur milieu minéral de Knop avec de l'auxine à 0,1 ppm pour favoriser le développement des racines, puis repiqués en serre, ont donné des Tabacs adultes qui ont fleuri et donné des graines.

Le cas de formation de bourgeons à partir de moelle de Tabac pourrait s'expliquer par l'existence d'îlots de liber interne ou d'amas cellulaires, déjà orientés vers la formation de bourgeons. Ceci ne semble pas exact en ce qui concerne les faits constatés au cours de ces recherches. En effet : le tissu de moelle de Tabac entre en prolifération intense sur le lait de Maïs total et sur la fraction neutre. Jamais, au cours de très nombreuses expériences, n'est apparu le moindre bourgeon, ni la moindre feuille, sur ces tissus de moelle cultivés dans ces conditions. Par contre, c'est fréquemment que des bourgeons se développent sur des tissus de moelle cultivés en présence de la fraction basique active, et plus encore avec la purine active. Si des îlots cellulaires étaient déjà orientés vers la formation de bourgeons, il semble qu'ils devraient, tôt ou tard, se manifester dans tous les cas où les tissus entrent en activité de division cellulaire (*cf.* STERLING, 1950 et 1951).

Dans le domaine de la morphogénèse également, sur des fragments d'entre-nœuds de tige de Tabac, une action antagoniste de l'auxine et de la substance isolée du lait de Maïs a pu être mise en évidence (Pl. VIII, fig. 22). Les entre-nœuds cultivés sur auxine seule sont pourvus de nombreuses racines. Les entre-nœuds cultivés sur la substance purifiée au lait de Maïs, n'ont pas de racines : mais par contre laissent apparaître de nombreux bourgeons.

Sur le milieu contenant à la fois de l'auxine et cette substance, il n'y a plus ni racines, ni bourgeons, mais un cal.

Bien que le but de ce travail ne soit pas l'étude du bourgeonnement en tant que tel, les observations qui ont été faites au cours de ces recherches obligent à considérer qu'une action caractéristique de la purine isolée du lait de Maïs, est de provoquer le bourgeonnement de tissus qui d'eux-mêmes ne peuvent ni entrer en division cellulaire, ni donner naissance à des bourgeons. Est également caractéristique de cette substance, son action antagoniste de l'auxine mise en évidence sur des cultures de fragments de tiges de Tabac. (Pl. VIII, fig. 22.)

Le bourgeonnement de fragments de tige de Tabac cultivés « in vitro » a fait l'objet de nombreuses études, particulièrement de SKOOG (1944), STERLING (1950-1951). Il n'est pas rare que des fragments de tiges ou de tissu cambial cultivés « in vitro » donnent naissance à des bourgeons (GAUTHERET, 1942, JACQUIOT, 1949 et 1955 sur l'Orme).

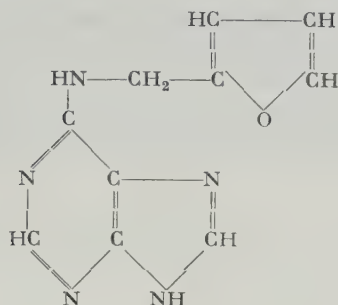
Cette faculté qu'ont des fragments de tiges de donner des bourgeons est renforcée dans certains cas, par des substances comme l'adénine (SKOOG, 1950 et JACQUIOT, 1951).

SKOOG et TSUI (1948), SKOOG (1950) et MILLER et SKOOG (1953), ont mis en évidence un antagonisme entre l'auxine et l'adénine sur l'apparition de bourgeons sur les fragments de tiges de Tabac. La kinétine a une action tout à fait semblable. Ceci permet de penser que la purine active isolée du lait de Maïs aurait quelque parenté avec ces substances.

4. Comparaison avec la kinétine

Les réactions biologiques de la purine active isolée du lait de Maïs sont très voisines de celles d'un autre corps isolé artificiellement par MILLER et coll. (1955) appelée par eux « kinétine » et identifiée à la 6-furfuryl amino-purine.

Cette substance est l'un des produits résultant d'un traitement à l'autoclave à 120° et à pH 4,3, d'une solution aqueuse d'acide désoxyribonucléique (A.D.N.) de sperme de Hareng ou de thymus de veau.



Les auteurs traitent ensuite cette solution avec du butanol, après l'avoir amenée à pH 6,8.

Ils évaporent l'extract butanolique, et le résidu, repris par l'eau, est versé sur une colonne d'échangeur de cation fort Dowex 50. L'éluion des corps fixés est faite avec de l'acide chlorhydrique 1,5 N.

La kinétine ne s'élue que lentement, et son apparition est suivie en mesurant la densité optique à 271 m μ .

Il faut remarquer que le groupement méthyl-furfuryl est fixé sur l'N situé en 6. Ce qui prouverait que l'A.D.N. autoclavé à 120° à pH 4,3 ne subit pas une simple hydrolyse, mais que des regroupements moléculaires doivent avoir lieu. Le pentose qui est à l'origine du groupement méthyl-furfuryl, n'est pas normalement fixé sur l'N en 6, mais en 9.

Les essais biologiques de cette substance sont faits avec des fragments de tissus de cal de Tabac. Ceux-ci sont obtenus de segments de tige ayant poussé sur le milieu de White en présence de 2 mg/litre d'auxine. Ce tissu, repiqué sur le même milieu ne donne pas de divisions mais seulement un grandissement cellulaire et un accroissement en poids limité. Dans le cas où de la kinétine est ajoutée au milieu, il apparaît dans ces tissus d'abondantes cellules de petite taille dans le rapport de 31/1 (MILLER et coll., 1955). Des résultats tout à fait semblables sont obtenus avec le tissu de moelle de Tabac. La kinétine n'a que peu d'action sur le tissu de Topinambour (« Piedalu 17 »), (NITSCH, 1957).

Des études faites par SKOOG et ses collaborateurs (1957), ainsi que par l'équipe de STEWARD sur la « kinétine », et ses dérivés ortho- et meta- substitués 6 benzyl-amino-purine (SHANTZ, 1958), en présence d'hydrolysate de caséine et d'auxine, il ressort que la « kinétine » et ses analogues favorisent la division cellulaire, mais que cette action requiert la présence d'auxine.

La « kinétine » est capable non seulement de provoquer la division cellulaire d'un tissu qui ne se divise pas de lui-même

comme c'est le cas de la moelle de Tabac, mais elle favorise aussi le développement des bourgeons sur les segments de tiges et les cultures de tissus de Tabac.

Sur un milieu de base contenant 2 mg/l d'auxine auquel sont ajoutées des quantités croissantes de kinétine, SKOOG et MILLER (1957) obtiennent les résultats suivants avec le tissu de cal de Tabac :

1° avec 0 « kinétine » : un tissu indifférencié où apparaissent surtout de grosses cellules et quelques courtes racines ;

2° avec 0,02 mg/l de « kinétine » : les racines sont abondantes ;

3° avec 0,2 mg/l de « kinétine » : il n'y a plus de racines, et accidentellement un bourgeon se forme ;

4° avec 0,5 à 1 mg/l de kinétine, non seulement il n'y a plus de racines, mais de très nombreux bourgeons apparaissent ;

5° au-delà, les concentrations de kinétine sont assez peu toxiques et les cultures survivent plus longtemps que les autres, bien qu'il y ait inhibition de développement du cal et des bourgeons (SKOOG, 1957), (voir aussi : SHRANK, 1957, WICKSON et THIMANN, 1958 et DEYSSON, 1959).

La fraction basique purifiée du lait de Maïs donne des résultats tout à fait correspondants (voir fig. 15, 16, Pl. VI ; 20 et 21, Pl. VIII).

Dans le tableau XV sont rassemblés les résultats d'une expérience faite pour comparer l'action, 1° de 2 ppm d'acide indole acétique seul, 2° avec 0,2 ppm de kinétine, 3° avec une concentration de la « purine active » isolée de la fraction cationique, correspondant à environ 15% du lait de Maïs initial, 4° 15% du lait de Maïs brut. Les résultats sont rapportés à 1000 mg de substance fraîche au temps T 0, après 30 jours (T 30) et en pour cent de substance fraîche (P.F.) et de substance sèche (P.S.) (voir aussi courbe II et III).

Le tableau XV montre que, contrairement aux tissus de Topinambour, les tissus de moelle de Tabac, sont beaucoup plus hydratés avant la mise en culture que les tissus témoins cultivés en présence d'auxine, et les tissus cultivés sur les fractions du lait de Maïs après 30 jours.

Après ce temps, les différences entre les cultures ne sont pas très considérables, quoique déjà significatives. Seules, les cultures sur le lait de Maïs total ont un aspect très dense et dur caractéristique. Les résultats des trois autres séries sont obtenus avec des cultures où l'action de l'auxine (grandissement) se manifeste d'abord, ce qui donne naissance à des tissus éclatés, gorgés d'eau. Mais lorsque le temps de culture se prolonge au delà de 30 jours, les

cultures avec auxine seule se dessèchent, et il n'est guère possible de les comparer avec les autres qui continuent à se développer. Les cellules très grosses au début des cultures, deviennent plus petites, le tissu devient ferme et il apparaît quelques bourgeons. Ceci est encore conforme à ce que SKOOG (1957) semble avoir lui-même remarqué pour la « kinétine ».

TABLEAU XV

Action comparée du lait de Maïs, de la kinétine, de la purine active isolée de la fraction cationique, en présence de 2 ppm d'AIA, sur le développement des tissus de moelle de Tabac (W. 38). Un témoin contenant 2 ppm d'AIA est indiqué.

	P.F.	P.S.	H ₂ O % de P.S	Substance sèche ‰	Coeffi- cient Accroisse- ment P.F.	Coeffi- cient Accroisse- ment P.S.
Moelle Tabac T.	1000	37	2600	37		
Moelle Tabac T. 30 j. AIA 2 ppm	1256	70	1600	56	1,2	1,8
Moelle Tabac T. 30 j. + kinétine 0,2 mg/l + AIA 2 ppm	1866	138	1200	74	1,8	3,7
Moelle Tabac T. 30 j. + Purine active 15 % environ + AIA 2 ppm	2311	162	1300	71	2,3	4,3
Moelle Tabac T. 30 j. + Maïs brut 15 % ..	2432	232,5	946	96	2,4	7,2

Non seulement une augmentation de substance fraîche, mais également une augmentation de substance sèche apparaît en faveur des tissus cultivés sur le lait de Maïs ou la purine active qui en est isolée.

Au départ de l'expérience envisagée, le tissu de moelle de Tabac contenait plus de 96 % d'eau, ce qui indique un tissu très pauvre. En présence d'auxine seule, la teneur en eau baisse à 94,5 % environ. En ajoutant de la kinétine à l'auxine, la teneur en eau baisse à 92,6 % et à 93 %, en ajoutant de la purine active isolée du lait de Maïs. Avec le lait de Maïs brut elle est de 90,4 %.

Le lait de Maïs, et la purine active favorisent la multiplication cellulaire de la moelle de Tabac. Une estimation des quantités d'acide désoxyribonucléique devait donner un aperçu des changements quantitatifs de ces substances au cours des cultures, et permettre d'envisager la croissance sous un aspect différent.

Il est possible, qu'un tissu aussi pauvre que la moelle de Tabac *adulte*, n'ait pas à sa disposition des molécules comme celles des bases puriques apportées par le lait de Maïs, ni d'auxine. L'apport de ces substances, lui permet d'entrer en division cellulaire en synthétisant des molécules d'acides nucléiques.

Dans le cas présent, il s'agit d'extraire l'A.D.N. à partir de très peu de matériel végétal (de l'ordre de 600 mg à 1 g) pour obtenir des renseignements sur les variations de ses quantités, au moyen de la technique d'OGUR et ROSEN (1950) que SILBERGER (1953) et SILBERGER et SKOOG (1953) ont utilisée dans un cas tout à fait semblable.

Les centrifugations ont été remplacées par des filtrations sur filtre d'Allihn n° 3.

Cette technique a ses limites (*cf.* MARKHAM in « Peach et Tracey », IV, p. 296), en particulier, il faudrait vérifier que l'hydrolyse à froid des acides ribonucléiques n'est pas accompagnée d'une hydrolyse partielle d'A.D.N. (SMILLIE et KROTKOV, 1960), (SIKKA, BAYAN et STERN (1961).

Ces réserves étant faites, il est néanmoins possible de l'utiliser pour obtenir des renseignements comparatifs, en prenant soin d'opérer toujours dans les mêmes conditions : le matériel végétal étant identique au début des expériences.

Les extraits de chaque série de tissus correspondant à l'A.D.N. selon la technique d'OGUR et ROSEN, sont amenés à 10 ml. L'estimation de l'A.D.N. a été faite en mesurant à 260 m μ la densité optique de ces extraits, au Beckman DK2.

L'appareil indique la D.O. par ml.

Les variations de D.O. exprimée en unités arbitraires, obtenues de cette manière ont permis d'établir le Tableau XVI.

Les P.F. des tissus cultivés sur des divers milieux après 15 ou après 30 jours ne montrent pas de grandes différences. Les P.S. par contre, manifestent beaucoup plus d'écarts en faveur du lait de Maïs et de la purine active.

Les D.O. indiquent les différences encore plus importantes sur les activités de croissance de ces tissus. La D.O. de l'extrait correspondant aux tissus cultivés en présence d'AIA est de 5,5 après 15 jours et 6 seulement après 30 jours.

La D.O. de l'extrait correspondant aux tissus cultivés sur kinétine est assez inattendue : après 15 jours il n'y a pas d'augmentation de l'A.D.N. par rapport au tissu initial. Après 30 jours, l'augmentation n'est pas très notable 4,2, soit 0,4 par rapport au tissu initial.

Pour ces deux tissus : le P.F. a plus que doublé en un mois, le P.S. a triplé. Mais la D.O. n'a pas subi la même augmentation.

Il est donc possible de dire que, dans ces deux cas, la croissance a surtout porté sur la matière extranucléique ou paraplasmiqque.

Les extraits correspondant aux tissus cultivés sur Maïs total ou la « purine active », manifestent au contraire une activité de croissance qui est proportionnellement plus importante au niveau des noyaux qu'ailleurs.

Les extraits de tissus cultivés sur le lait de Maïs ont une D.O. de 25,6 après 15 jours, et 63,5 après un mois, ce qui indiquerait que l'A.D.N. initial a été multiplié par 6,7 et 16,7.

TABLEAU XVI

Variations du P.F., et de D.O. (1) à 260 m μ (bases A.D.N.) des tissus de moelle de Tabac cultivés sur : AIA seul, lait de Maïs total, kinétine + AIA, purine active du lait de Maïs + AIA, après 15 jours et 30 jours.

	Tissus de moelle au temps 0			P.F. (10 cultures) 570 mg	P.S. (10 cultures) 25 mg	D. O. 3,8
	AIA 2 ppm			Maïs total 15 %		
	P.F.	P.S.	D.O.	P.F.	P.S.	D.O.
Après 15 jours	852	47	5,5	780	65	25,6
Après 30 jours	1330	85	6	1320	120	63,5
	Kinétine 0,2 ppm + AIA			Purine active du lait de Maïs + AIA		
	P.F.	P.S.	D.O.	P.F.	P.S.	D.O.
	P.F.	P.S.	D.O.	P.F.	P.S.	D.O.
Après 15 jours	998	55	3,4	970	64	8,6
Après 30 jours	1170	77	4,2	1370	98	11,5

Il est possible de retrouver un peu de cette activité dans la purine active ; elle a plus que doublé après 15 jours et triplé après 1 mois la quantité d'A.D.N. initiale. Il faut noter que, dans cette expérience, la kinétine et la purine active ont manifesté une activité relativement faible, mais la synthèse d'A.D.N. est cependant plus rapide dans le cas de cette purine que dans le cas de la kinétine.

(1) Exprimée en unités arbitraires.

5. *Comparaison* *avec les résultats de SHANTZ et STEWARD*

Il est plus difficile de comparer ces résultats avec ceux que SHANTZ et STEWARD ont obtenu en étudiant le lait de Maïs parce que les essais biologiques et les techniques de fractionnement utilisés sont différents.

Du lait de Maïs, ils ont isolé un arabinoside de l'acide indole acétique actif sur la division cellulaire, et l'élongation du coléoptile d'Avoine (1957). Ils ont isolé également cinq composés analogues aux purines, parmi lesquels ils ont identifié l'adénine, l'adénosine et l'uridine. Mais ces substances ne sont pas actives, ils pensent qu'elles agissent comme co-facteurs.

Du Marron d'Inde, ils ont isolé, de l'albumen liquide, quatre substances dont l'une a été caractérisée comme étant l'acide chlorogénique (1956). De l'albumen solide, ils ont isolé un corps analogue aux leuco-anthocyanes. La formule de cette dernière substance est difficile à établir car elle ne cristallise pas facilement. Elle est active sur la division cellulaire (1955).

Ces substances ont été purifiées par précipitations fractionnées dans des solvants organiques suivies de chromatographie ou de réextraction liquide/liquide automatique.

Les résultats obtenus à partir du lait de Coco, avec les fractionnements sur échangeurs d'ions sont plus faciles à comparer, au moins en ce qui concerne les techniques. L'éluat cationique est traité par une colonne d'échangeurs basiques forts (Dowex 1-OH⁻). L'activité de cette fraction est retenue par l'échangeur, (amphotères). L'éluat chlorhydrique de cet échangeur donne une fraction très active en présence de la fraction neutre. Cet éluat réadsorbé sur un échangeur acide fort (Dowex 50 H⁺), en est élué sélectivement par une solution ammoniacale à 0,15 N. L'activité se rassemble dans les dernières fractions, caractérisée par une forte adsorption dans l'U.V. Ensuite, avec l'alcool à 85% est précipitée une fraction inactive. La fraction active, soluble, est encore réadsorbée sur une colonne d'échangeur basique forte et éluee avec HCl. Finalement, les fractions présentant une forte absorption en U.V. sont chromatographiées sur papier Whatman n° 3 dans le solvant butanol/acétique/eau. Le papier est découpé en 12 zones, d'où sont retirées 12 fractions, toutes actives à 10 ppm, toujours en présence de la fraction neutre. SHANTZ, POLLARD et STEWARD concluent (1959) que ces fractions contiennent plusieurs substances analogues aux purines, et n'agissent, comme la kinétine, qu'en présence d'auxine.

STEWARD et SHANTZ (1958 et 1959), affirment d'autre part que l'adénine, l'adénosine et l'uridine n'ont pas d'action déce-

lable sur les cultures de tissus. Il a été vérifié au cours de ces recherches que l'adénine n'a aucune action sur la croissance de la moelle de Tabac.

Du lait de Coco avec une technique employant des échangeurs d'ions forts, du lait de Maïs avec une technique différente, ils ont isolé des fractions qui favorisent la division cellulaire des cultures de tissus de Carotte, et ces fractions contiennent toutes des substances analogues aux purines. A ce jour, aucune de ces substances actives ne semble avoir été encore caractérisée.

Leurs résultats, en ce qui concerne le lait de Maïs, confirment ceux qui ont été obtenus au cours des recherches exposées ici, à ces différences près :

1° Dans le cas de la présente recherche, le Maïs est fractionné par les techniques d'échangeurs mélangés en trois groupes (ou quatre groupes) de substances actives.

2° De la fraction cationique il n'est isolé qu'une seule substance active sur la division cellulaire.

3° Le spectre de la substance active, à l'état de purification où elle a été analysée est très proche de celui de l'adénine (ce qui est en accord avec le fait qu'elle n'est pas fixée par les échangeurs basiques forts). Mais ce n'est ni l'adénine, ni un adénoside, qui sont sans action sur les cultures de moelle de Tabac.

4° La substance isolée du lait de Maïs s'apparente également à la kinétine, non seulement par le fait qu'elle favorise la division cellulaire de tissus incapables par eux-mêmes d'entrer en division, mais encore parce qu'elle peut provoquer l'apparition de bourgeons à partir de tissu de moelle de Tabac, et non pas seulement à partir de cals repiqués, comme c'est le cas dans l'expérience rapportée par SKOOG et MILLER (1957). Dans ce cas, la « purine active » isolée du lait de Maïs a besoin de l'auxine pour manifester son action, car les bourgeons n'apparaissent sur la moelle que lorsqu'un cal s'est formé. Il n'en va pas de même lorsqu'il s'agit de fragment de tige où le cambium apporte les substances de croissance nécessaires. Un fragment de tige de Tabac cultivé sur un milieu sans auxine produira des bourgeons. Ces bourgeons sont plus abondants et plus précoces en présence de la « purine active ». Mais en présence d'auxine et de cette substance, seul un cal se formera (*cf.* Pl. VII, fig. 22).

DISCUSSION ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHES

Deux de ces faits méritent d'être examinés attentivement :

1^o La « purine » isolée de la fraction basique n'est active qu'en présence d'auxine.

2^o La fraction neutre agit sur l'élongation et la division cellulaire et ne provoque jamais d'apparition de bourgeons ni de racines.

Le premier point est caractéristique de la kinétine étudiée par SKOOG et coll. et des substances isolées du lait de Coco et du lait de Maïs par SHANTZ et STEWARD. SKOOG et MILLER (1957) avaient déjà insisté sur ce fait. Une conclusion semble donc s'imposer : les divisions cellulaires provoquées par la kinétine et les dérivés puriques actifs sont dues non à ces substances mêmes, mais à un complexe protidique où elles entrent en composition, soit directement, soit par l'intermédiaire d'une chaîne enzymatique, avec l'auxine ou les substances semblables.

Ces corps (auxines, purines) dont les quantités en présence peuvent varier, déterminent tantôt une activité cellulaire de grandissement de la membrane (prédominance de l'auxine), tantôt une activité de division cellulaire où les purines prennent le pas sur les auxines (mérésis), tantôt enfin une activité orientée vers la formation de méristèmes qui donnent des bourgeons (prédominance accrue des purines). Tout ceci est rattaché à un ensemble enzymatique que toute cellule végétale vivante doit normalement posséder.

Dans tout tissu en voie de division cellulaire, ces deux groupes de substances : auxines - purines, doivent se trouver. La distinction entre substances de grandissement et substances de division cellulaire apparaît de plus en plus trop catégorique. De même qu'il n'y aurait pas de divisions cellulaires sans la présence d'auxine, il n'y aurait pas de grandissement cellulaire sans la présence de « kinétine » (DAS, PATAU et SKOOG, 1956).

A propos du second point, il faut considérer que la fraction neutre ne doit son activité ni à une quelconque « kinine » libre, ni à des auxines libres. Les échangeurs forts, utilisés en excès par rapport à la quantité d'extrait à traiter, auraient fixé de tels corps : ceci a été vérifié (BEAUCHESNE et JOUANNEAU, 1960).

Il est donc permis de faire l'hypothèse suivante : l'activité de division cellulaire que manifeste la fraction neutre du lait de Maïs sans adjonction d'auxine, contrairement à la fraction basique, doit être due à un complexe protégeant le groupe auxine - purine qui lui serait lié. La « purine active » isolée de la fraction basique

serait un élément de ce complexe, ainsi que les auxines acides, ou neutres s'il en existe.

L'arabinoside de l'acide indolacétique isolé du lait de Maïs par SHANTZ et STEWARD serait un autre fragment du même complexe, qui comporterait le « groupe » auxine-pentose purine. Chacun étant lié indépendamment ou ensemble à un support moléculaire plus important. Ceci est une pure hypothèse, mais elle est suggérée par les faits expérimentaux suivants :

a) Au cours de la dialyse contre H_2O , « les substances » actives traversent la membrane, tandis qu'un précipité se forme dans le sac de dialyse, et qu'une forte pression osmotique se manifeste. Si la dialyse est poursuivie avec de l'alcool à 50%, le précipité se redissout, et il apparaît encore, dans le dialysat, des substances actives sur l'élongation et la division cellulaire. Une dialyse contre de l'alcool à 50% ou 60% est plus complète et plus rapide qu'une dialyse contre de l'eau.

b) Les échangeurs d'ions utilisés présentent un taux de divinylbenzène de 8%, ce qui limite les échanges de groupements acides ou basiques aux seules petites molécules. Si la substance « neutre » est un complexe lié à une molécule protidique, ou, ce qui est probable, lipo-protidique, soluble dans l'alcool à 50%, l'action des échangeurs n'aura pu se faire sentir sur ces molécules, d'où la possibilité de retrouver dans le filtrat — dit « neutre » — un complexe qui n'a pu être atteint par les échanges à cause de sa taille moléculaire.

Il est possible de mettre en évidence dans la fraction neutre l'existence des molécules protidiques à l'aide de réactif tel que le bleu de bromophénol, en solution alcoolique saturée de $HgCl_2$. La présence d'un « adialysable » est une autre preuve de l'existence de molécules protidiques. Le fait qu'elles soient moins solubles dans l'eau (précipitation) que dans l'alcool à 50%, est par ailleurs en faveur d'un complexe lipoprotidique. Au cours de la dialyse, par le simple jeu des solvants, le complexe « auxine-pentose purine » dialyserait plus ou moins rapidement selon que le solvant est de l'eau, agissant peu sur les liaisons lipidiques, ou un solvant comme l'alcool à 50% lipophile, agissant plus rapidement sur de telles liaisons.

Des travaux sont en cours pour vérifier ces différentes hypothèses.

Dans le lait de Maïs, il y aurait donc en équilibre, avec ce complexe, des éléments mêmes de celui-ci : purine active, auxine et analogues.

Quant à l'essai biologique reposant sur le comportement du tissu de moelle de Tabac en présence des substances de croissance,

ce n'est pas sans raison qu'il a été choisi. En effet, la seule substance dont les effets physiologiques sont comparables avec ceux de la « purine » isolée du lait de Maïs, est la « kinétine ». Cette substance est le produit d'un traitement à 120°C par l'acide chlorhydrique d'A.D.N. animal, mais malgré cela, il était utile de l'avoir comme référence d'activité. Or, le test de la moelle de Tabac sert à étudier l'effet de la « kinétine » et de ses analogues naturels ou artificiels, c'est pourquoi il a été conservé.

C'était sans doute se limiter, mais c'était à coup sûr se garder d'une dispersion à laquelle pouvaient entraîner d'autres essais biologiques moins bien connus et moins spécifiques. Les résultats acquis sont une preuve que cette limitation volontaire à ce seul test, spécialement au cours des étapes de purification, n'a pas été stérile.

Les recherches se poursuivent pour obtenir assez de cette « purine active » et la caractériser, mais l'essentiel semble se situer au-delà de l'isolement d'une substance déterminée pour la caractériser. Si important que soit ce travail, il n'aura pas fait beaucoup avancer la connaissance de la physiologie de la croissance, s'il n'est pas possible de saisir l'ensemble où s'insèrent dans le métabolisme de la plante, cette substance et les autres qui s'y apparentent par leur comportement chimique et physiologique.

CONCLUSIONS

Trois groupes différents de substances de croissance existent dans le lait de Maïs, d'où elles ont été isolées à l'aide d'échangeurs d'ions mélangés. Ceci est acquis définitivement.

Le groupe basique peut lui-même être scindé en deux : un groupe comprenant les amphotères à tendance acide, qui manifeste une activité sur le test mésocotyle de NITSCH, et un groupe comprenant les amphotères basiques et les bases organiques, particulièrement les purines, qui stimule, en présence d'auxine, la division cellulaire de la moelle de Tabac. De ce dernier groupe a été isolée une substance non encore caractérisée, qui peut être classée avec certitude dans une catégorie de purines très voisine de l'adénine.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

L'étude systématique des groupes acide et neutre n'ayant pas été poursuivie, les propriétés physiques et chimiques de leurs constituants ne sont pas encore connues.

Cependant il est possible de dire que les constituants actifs du groupe neutre dialysent et sont solubles dans l'alcool à 50%.

Il n'est surtout question ici que de la purine active isolée du lait de Maïs.

— Au cours de dialyse, cette substance traverse les membranes.

— Elle est soluble dans l'éthanol à 90% et insoluble dans l'éther.

— Elle donne dans l'U.V. un spectre d'absorption qui est caractéristique des purines, et très proche de celui de l'adénine.

— Substance basique, elle est très fortement retenue par les échangeurs de cations et son élution est longue. Par contre, en solution alcoolique à 50%, elle n'est pas fixée par les échangeurs basiques forts, type Dowex 2, contrairement aux amphotères.

— En électrophorèse plane, elle se déplace peu par rapport aux bases organiques comme l'histidine ou l'arginine.

— Avec les sels d'argent, en présence de bleu de bromophénol,

ou avec les sels de mercure, elle donne des complexes comme les bases nucléiques.

— Grâce à ces réactions caractéristiques, sa présence peut être révélée sur les bandes d'électrophorèse.

Outre son absorption dans l'U.V., elle émet une fluorescence qui permet également de la repérer dans le cas d'électrophorèse sur amidon.

PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES

Voici d'abord un aperçu très bref de l'activité des groupes acide et neutre isolés du lait de Maïs.

Activité de la fraction acide.

— Le groupe acide n'a pas été étudié en détail au cours de cette recherche. Il contient les auxines acides, et d'autres substances non déterminées, actives sur le test mésocotyle de NITSCH.

Activité de la fraction neutre.

— La fraction neutre agit sur l'élongation du test mésocotyle de NITSCH et stimule la division cellulaire de la moelle de Tabac. Son action sur ce point est plus rapide que celle de la « purine active » isolée de la fraction basique, mais elle ne provoque jamais de formation de bourgeons ni de racines.

Activité de la « purine active » du lait de Maïs.

Cette substance active est non seulement inductrice de division cellulaire dans les tissus incapables de proliférer par eux-mêmes, mais peut encore provoquer l'apparition de bourgeons sur de tels tissus (moelle de Tabac). Ces bourgeons repiqués en serre ont donné des plantes adultes et des graines fertiles.

Cette propriété qu'elle a de favoriser la division cellulaire de tissus qui en ont perdu la possibilité, est peut-être due au fait que sa constitution chimique serait proche de celle de certaines bases nucléiques. Ceci permettrait son intégration relativement rapide dans la synthèse de molécules d'acides nucléiques, et ainsi pourrait déclencher le processus de la multiplication de la masse d'acide nucléique, et par suite celle des noyaux.

Son action sur la moelle de Tabac ne se manifeste qu'en présence d'auxine, mais sur des fragments de tige, l'action de ces deux substances est antagoniste. Il ne se forme ni racine, ni bourgeons, mais un cal.

Au cours de ces recherches, des dosages d'A.D.N., quoique sommaires, ont permis de mettre en évidence une action directe

de cette substance sur la synthèse de la masse totale des nucléoprotéines, envisagées surtout du point de vue acide *désoxyribonucléique*. Cet effet se manifeste même dans le cas de concentration limite, au point de vue activité, de cette purine active isolée de la fraction basique du lait de Maïs.

Au cours de cette étude, il apparaît que cette substance est plus active sur la division cellulaire (caryocinèse et cytokinèse) que la kinétine étudiée par MILLER et ses collaborateurs. Elle provoque également, plus rapidement que la kinétine, l'apparition de bourgeons sur le tissu de moelle de Tabac cultivé « in vitro ».

Il reste à savoir comment cette « purine active » s'introduit dans le métabolisme des tissus ; est-ce à la manière d'un élément qui prendrait place dans un édifice, comme une pierre dans un mur (élément statique) ? Dans ce cas la croissance liée à la présence de cette substance se ralentirait dès qu'elle a disparu.

Ou, au contraire, sa présence facilite-t-elle la synthèse des acides nucléiques, ou provoque-t-elle la mise en route d'activités catalytiques spécifiquement orientées vers l'accroissement des nucléoprotéines elles-mêmes ? Les tissus devraient alors conserver une activité de division cellulaire sur des milieux d'où cette substance aurait été exclue.

Des tissus de moelle de Tabac cultivés d'abord sur du lait de Maïs ou sur la « purine active », et repiqués sur des milieux sans lait de Maïs, avec ou sans auxines, ont manifesté une activité propre de division cellulaire qui s'est poursuivie pendant au moins deux repiquages. Sur le milieu sans auxine la croissance des tissus a été limitée, mais des ébauches de bourgeons sont apparues (Pl. II, fig. 5 et 6).

Ces faits seraient plutôt en faveur de l'action dynamique de la « purine active », mais cette hypothèse nécessite une confirmation qui ne pourra être obtenue qu'avec de nouvelles recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- BEAUCHESNE (G.), 1957. — Les substances de croissance du lait de Maïs immature. *C.R. Acad. Sc.*, **244**, 112-115.
- BEAUCHESNE (G.), 1959. — Séparation de substances de croissance d'extrait de Maïs immature. In « *Plant Growth Regulation* », *Iowa State University. Press. Amer. Iowa U.S.A.* (1961).
- BEAUCHESNE (G.) et JOUANNEAU (J.-P.), 1960. — Progrès dans la technique de séparation et l'étude de la fraction neutre des substances de croissance de graines de Maïs immatures. *C.R. Acad. Sc.* **251**, 2396-2398.
- BEAUCHESNE (G.) et NETIEN (G.), 1952. — Séparation des acides aminés d'un extrait de graines de Maïs immatures à l'aide d'une résine synthétique et identification par chromatographie de partage sur papier. *C.R. Soc. Biol.*, **146**, 1342-1343.
- BENSON (A.), 1955. — Phosphorylated sugars in « *Modern Methods of Plants Analysis* » Peach et Tracey. **111** 113-144, *Springer-Verlag*, Berlin.
- BERGER (J.) et AVERY (G.S.), Jr. 1944. — Isolation of an auxin precursor and an auxin (Indoleacetic acid) from Maize. *Amer. Journ. Bot.* **31**, 199-203.
- BIER (M.), 1959. — Electrophoresis. Theory, Method and applications. *Academic Press*. New-York.
- BISERTE (G.), 1952. — Fractionnement d'hydrolysats peptiques de protéines. Thèse de Doct. d'Etat. (Sci. Phys.) Dactylographiée, Lille.
- BLOCK (R.J.), 1942. — A new method for the separation of the basic aminoacids from proteins hydrolysates. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **51**, 252-256.
- BLOCK (R.J.), DURRUM (E.L.) et ZWEIG (G.), 1955. — A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. *Academic Press*, New York.
- BLOEMENDAL (H.), 1959. — Starch electrophoresis. I. Starch block electrophoresis *Journ. Chromatog.* **2**, 121-135.
- BLOEMENDAL (C.), 1960 a. — Starch electrophoresis. II. Starch column electrophoresis. *Journ. Chromatog.*, **3**, 1-11.
- BLOEMENDAL (C.), 1960 b. — Starch electrophoresis. III. Starch Gel electrophoresis. *Journ. Chromatog.*, **3**, 509-519.
- BOULANGER (P.) et BISERTE (G.), 1950. — La chromatographie de partage. *Exp. Ann. Biochem. Med.*, **11**, p. 53-121.
- BOULANGER (P.) et POLONOVSKI (J.), 1959. — Traité de Biochimie générale. Masson éd., Paris.
- CAPLIN (S.M.) et STEWARD (F.C.), 1948. — Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science*, **108**, 655-657.
- CARLSSON (L.A.), 1954. — Starch column electrophoresis. *Acta. Chem. Scand.*, **8**, 510-520.
- CHAMPIGNY (M.L.), 1960. — L'influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les feuilles de *Bryophyllum Daigremont-*

- tianum* Berger. Thèse Doct. d'Etat (Sci. Nat.), Lesot éd., Paris et *Rev. Gén. Bot.*, **67**, 65-223.
- DAS (N.K.), PATAU (K.) et SKOOG (F.), 1956. — Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indoleacetic acid in excised Tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.* **9**, 640-651.
- DE ROPP (R.S.), 1953. — « Biological effects of fractions from coconut milk (presented at meeting of Amer. Inst. Biol. Sci. Madison Wisconsin, sept. 1953).
- DE ROPP (R.S.), VITUCCI (J.C.), HUTCHINGS (B.L.) et WILLIAMS (J.H.), 1952. — Effect of coconut milk fractions on growth of carrot tissue. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **81**, 704-705.
- DEYSSON (G.), 1959. — La kinétine, nouvelle hormone de croissance végétale. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **106**, 369-386.
- DUHAMET (L.), 1949. — Action du lait de Coco sur la croissance des tissus de tubercule de Topinambour cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.* **229**, 1353-1355.
- DUHAMET (L.), 1960 a. — Action du lait de Coco sur la croissance des tissus de Crown gall de Scorsonère cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.* **230**, 770-771.
- DUHAMET (L.), 1950 b. — Action du lait de Coco sur la croissance des tissus de *Parthenocissus tricuspidata* cultivés « in vitro ». *C.R. Soc. Biol.*, **144**, 59-61.
- DUHAMET (L.), 1951 a. — Action du lait de Coco sur la croissance des cultures de tissus de Crown-gall de Vigne, de Tabac, de Topinambour et de Scorsonère. *C.R. Soc. Biol.*, **145**, 1781-1783.
- DUHAMET (L.), 1951 b. — Action du lait de Coco sur les tissus accoutumés aux hétéro-auxines de Scorsonère, de Tabac et de Vigne. *C.R. Soc. Bi l.*, **145**, 1783-1785.
- DUHAMET (L.), 1951 c. — Action comparée du lait de Coco sur une souche de tissus de Carotte et sur des fragments prélevés sur des racines. *C.R. Soc. Biol.*, **145**, 1841-1843.
- DUHAMET (L.), 1957. — Sur la diversité des réactions de quelques tissus végétaux « in vitro », en présence de lait de Coco, d'auxine, et de mélange de ces substances. *C.R. Soc. Biol.*, **151**, 2043-2045.
- GALSTON (A.W.) et PURVES (W.K.), 1960. — The mechanism of action of Auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **11**, p. 239-276.
- GAUTHERET (R.J.), 1939. — Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de Carotte. *C.R. Acad. Sc.*, **208**, 118-120.
- GAUTHERET (R.J.), 1942. — Manuel technique de culture de tissus végétaux. Masson, éd., Paris.
- GAUTHERET (R.J.), 1943. — Hétéro-auxines et cultures de tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **24**, 13-41.
- GAUTHERET (R.J.), 1959. — La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations. Masson éd., Paris.
- GRENOT (C.), 1959. — Recherches sur quelques substances de croissance (dérivés indoliques) contenues dans le lait de Maïs immature. Diplôme d'études supérieures (Sc. Nat.), Paris.
- GYORFFY (B.), REDEI (G.) et REDEI (Mme G.), 1955. — La substance de croissance du Maïs laiteux. *Acta Bot. Acad. sc. Hungaricae*, **II**, 57-76.

- HELLER (R.), 1953. — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés « in vitro ». Thèse Doct. d'Etat (Sci. Nat.). Lesot éd. Paris et *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.*, **14**, 1-223.
- HEMBERG (T.), 1958. — Auxins and growth inhibiting substances in maize kernels. *Physiol. Plant*, **11**, 284-310.
- HENDERSON (J.H.M.), DURREL (M.E.) et BONNER (J.), 1952. — The culture of normal sunflower stem callus. *Amer. Journ. Bot.* **39**, 467-473.
- HILDEBRANDT (A.C.), RIKER (A.J.) et DUGGAR (B.M.), 1946. — Influence of crown gall bacterial products, crown gall tissue extracts and yeast extract on growth « in vitro » of excised tobacco and sunflower tissue. *Cancer Res.* **6**, 368-377.
- HULME (A.C.), 1953. — An action of strongly basic anion exchange resins and solutions containing sugars. *Nature*, **171**, 610-611.
- JABLONSKI (J.R.) et SKOOG (F.), 1954. — Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, **7**, 16-24.
- JACQUIOT (C.), 1949. — Observations sur la néoformation de bourgeons chez le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.* **221**, 529-530.
- JACQUIOT (C.), 1951. — Action du méso-inositol et de l'adénine sur la formation de bourgeons par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **233**, 815-817.
- JACQUIOT (C.), 1955. — Formation d'organes par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* et de *Betula verrucosa* Gaertn. cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **240**, 557-558.
- JOLCHINE (G.), 1956. — Les acides organiques des feuilles de « *Bryophyllum Daigremontianum* » Berger. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **38**, 481-493.
- KEFFORD (N.P.), 1955. — The growth substances separated from plant extracts by chromatography. *Journ. Exptl. Bot.*, **6**, 129-151.
- KITCHENER (J.A.), 1957. — Ion Exchange Resins. Methuen and Co. Publishers. London.
- KOVOOR (A.), 1953 a. — Action du jus de Raisin sur la croissance des tissus de crown-gall de Scorsonère cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **236**, 309-311.
- KOVOOR (A.), 1953 b. — Action stimulante de quelques extraits de fruits et de graines sur le développement des tissus de crown-gall de Scorsonère cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **237**, 271-272.
- KOVOOR (A.), 1954. — Action de quelques substances stimulantes d'origine naturelle sur le développement des tissus végétaux cultivés « in vitro ». *Ann. Biol.*, **30**, 417-429.
- KOVOOR (A.), 1960. — Action de quelques régulateurs de croissance extraits de deux espèces de *Parthenocissus* sur le développement des tissus végétaux cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **250**, 1903-1905.
- KULESCHA (Z.), 1951. — Recherche sur l'élaboration de substances de croissance par les tissus végétaux. Thèse Doct. d'Etat (Sci. Nat.), Paris. Lesot éd. et *Rev. Gén. Bot.* 1952, **59**, 92-111, 127-157, 195, 208 et 241-264.
- KUNIN (R.), 1958. — Ion Exchange Resins. 2^e édition. Wiley, Publishers, New-York.

- KUNKEL (H.G.) et TRAUTMAN (R.), 1959. — Zone electrophoresis in various types of supporting media. in « Electrophoresis Theory. Methods and applications », Milan Bier. *Academic Press* New-York.
- KUPILA (S.), BRYAN (A.M.) et STERN (M.), 1961. — Extractability of DNA and its determination in tissues of higher plants. *Plant Physiol.*, **36**, 212-215.
- LANCE (C.), 1957. — Remarques sur l'emploi de différents critères de croissance dans le cas de tissus végétaux cultivés « in vitro ». *Rev. Gén. Bot.*, **64**, 123-130.
- LEDERER (E.), 1949. — Progrès récents de la chromatographie (I). *Act. Sc. Ind.* 1079. Hermann. éd. Paris.
- LEDERER (E.) et LEDERER (M.), 1957. — Chromatography. Elsevier. Amsterdam.
- LEDERER (E.) et coll., 1960. — Chromatographie en chimie organique et biologique. Masson, éd., Paris.
- LINGAPPA (Y.), 1957. — Tissue cultures of *Solanum tuberosum* and *Ipomea pandurata*. *Amer. Journ. Bot.*, **44**, 419-423.
- LIORET (C.), 1952. — Action du lait de Coco sur les échanges gazeux respiratoires de tissus de Crown gall de Scorsonère (*Scorsonera hispanica* L.) cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **234**, 237-239.
- LIORET (C.), 1960. — Recherches sur le métabolisme de deux tissus végétaux cultivés « in vitro ». Thèse Doct. d'Etat (Sci. Nat.), Lesot éd., Paris.
- MARKHAM (R.), 1955. — Nucleic acids, their components and related compounds. in « Modern methods of Plant analysis ». Peach et Tracey. IV, 245-334. *Springer-Verlag*, Berlin.
- MILLER (C.O.), 1961. — Kinetin like compound in Maize. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci. U.S.A.*, **47**, 170-174.
- MILLER (C.O.) et SKOOG (F.), 1953. — Chemical control of bud formation in Tobacco stem segments. *Amer. Journ. Bot.* **40**, 768-773.
- MILLER (C.O.), SKOOG (F.), SALTZA (Von M.M.) et STRONG (F.M.), 1955. — Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. *Journ. Amer. Chem. Soc.* **77**, 1392.
- MILLER (C.O.), SKOOG (F.), OKUMURA (F.S.), SALTZA (Von M.M.) et STRONG (F.M.), 1955. — Structure and synthesis of kinetin. *Journ. Amer. Chem. Soc.* **77**, 2662.
- MOREL (G.) et WETMORE (R.H.), 1951. — Tissue culture of Monocotyledons. *Amer. Journ. Bot.* **38**, 138-140.
- MORETTI (J.), BOUSSIER (G.) et JAYLE (M.F.), 1957. — Réalisation technique et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 693-705.
- MORETTI (J.), BOUSSIER (G.) et JAYLE (M.F.). — Nouvelle méthode de purification des protéines par électrophorèse sur gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 59-65.
- NACHOD (F.C.) et SCHUBERT (J.), 1956. — Ion Exchange Technology. *Academic Press*. New-York.
- NETIEN (G.) et BEAUCHESNE (G.), 1952. — Action d'un extrait liquide de graines de Maïs immatures (lait de Maïs) sur la croissance des tissus de tubercules de Topinambour cultivés « in vitro » *C.R. Acad. Sc.*, **234**, 1306-1308.

- NETIEN (G.) et BEAUCHESNE (G.), 1953. — Différentes substances de croissance décelées dans l'extrait laiteux de graines de Maïs et étudiées sur culture « in vitro » de tissus de Topinambour. *C.R. Acad. Sc.*, **237**, 1026-1028.
- NETIEN (G.) et BEAUCHESNE (G.), 1954. — Essai d'isolement d'un facteur de croissance présent dans un extrait laiteux de caryopses de Maïs immatures. *Ann. Biol.*, **30**, 437-443.
- NETIEN (G.), BEAUCHESNE (G.) et MENTZER (C.), 1951. — Influence du lait de Maïs sur la croissance des tissus de Carotte « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **233**, 92-93.
- NEUBERG (G.) et KERB (J.), 1912. — Über die Fällungsmittel für Aminosäuren. *Biochem. Ztschr.* **40**, 498-512.
- NITSCH (J.P.), 1951. — Action du jus de Tomate sur la croissance des tissus de Crown-gall cultivés « in vitro ». *C.R. Acad. Sc.*, **233**, 1676-1677.
- NITSCH (J.P.), 1954. — L'action sur la croissance des cultures de tissus du liquide séminal d'*Allanblackia parviflora* A. Chev. *C.R. Acad. Sc.*, **238**, 141-143.
- NITSCH (J.P.), 1960. — Présence d'une substance type « cinétine » dans le jus de Tomate. *Bull. Soc. Bot.*, **107**, 263-267.
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1954. — Action du jus de Tomate sur la croissance de certains tissus et organes végétaux. *Bull. Soc. Bot., Fr.*, **101**, 433-440.
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1956. — Studies in the growth of coleoptile and first internode section. A New sensitive straight growth test for auxin. *Plant. Physiol.* **31**, 94-111.
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1956. — Auxin dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. I. *Amer. Journ. Bot.*, **43**, 839-851.
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1957. — Auxin dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. II. Organic, nitrogenous compounds. *Amer. Journ. Bot.*, **44**, 555-564.
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1959. — Growth factor in Tomato Yonkers N.Y. U.S.A. (1961).
- NITSCH (J.P.) et NITSCH (C.), 1960. — Problème de l'action des auxines sur la division cellulaire : présence d'un cofacteur de division sans le tubercule de Topinambour. *Ann. de Phys. Vég. INRA* (sous presse).
- NOBECOURT (P.), 1939. — Sur la perennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C.R. Soc. Biol.*, **130**, 1270-1271.
- OGUR (M.) et ROSEN (G.), 1950. — The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.* **25**, 262-276.
- OVERBEEK (J. van), CONKLIN (M.E.) et BLAKESLEE (A.F.), 1941. — Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, **94**, 350-351.
- OVERBEEK (J. van), SIU (R.) et HAAGEN SMIT (A.J.), 1944. — Factors effecting the growth of *Datura* embryos « in vitro ». *Amer. Journ. Bot.*, **31**, 219-224.
- PACHECO (H.), 1951. — Caractérisation de l'acide indolacétique dans un jus de Pomme de terre par chromatographie de partage sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1915-1918.

- PARIS (D.) et DUHAMET (L.), 1953. — Action d'un mélange d'acides aminés et de vitamines sur la prolifération des cultures de tissu de crown-gall de Scorsonère. Comparaison avec l'action du lait de Coco. *C.R. Acad. Sc.* **236**, 1690-1692.
- PARIS (D.), DUHAMET (L.) et GORIS (A.), 1954. — Action des vitamines et des acides aminés contenus dans le lait de Coco sur la prolifération d'une souche de tissus de Carotte. *C.R. Soc. Biol.* **148**, 296-299.
- PAVILLARD (J.), 1953. — Contribution à l'étude de la croissance des plantes virosées : Virus et auxines. Thèse Doct. d'Etat (Sci. Nat.), Lesot, éd., Paris.
- PIGMAN (W.W.) et GOEPP (R.M.), 1948. — Carbohydrate chemistry. *Academic Press*, New York.
- RIKER (A.J.) et GUTCHE (A.E.), 1948. — The growth of sunflower tissue « in vitro » on synthetic media with various organic and inorganic sources of nitrogen. *Amer. Journ. Bot.*, **35**, 227-238.
- ROBBINS (W.J.), 1952. — Effect of autolysed yeast and peptone on growth of excised corn root tips in the dark. *Bot. Gaz.* **74**, 59-79.
- ROSEMAN (S.), ABELES (R.M.) et DORFMAN (A.), 1952. — Behaviour of carbohydrates towards strongly basic ion-exchange resins. *Arch. Biochem. Biophys.*, U.S.A., **36**, 232-233.
- SAMUELSON (O.), 1953. — Ion Exchangers in analytical chemistry. Wiley, Publishers, New York.
- SHANTZ (E.M.) et STEWARD (F.C.), 1952. — Coconut milk factor : the growth promoting substances in coconut milk. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 6133-6135.
- SHANTZ (E.M.) et STEWARD (F.C.), 1955. — The identification of compound « A » from Coconut milk as 1,3-diphenylurea. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 6351-6353.
- SHANTZ (E.M.) et STEWARD (F.C.), 1956. — Growth promoting substance in the liquid endosperm of immature *Aesculus* fruit ; *Plant Physiol. Suppl.* **31**, XXXIX.
- SHANTZ (E.M.) et STEWARD (F.C.), 1957. — The growth stimulating substances in extracts of immature corn grain. *Plant Physiol. Suppl.* **32**, VIII.
- SHANTZ (E.M.), POLLARD (J.K.) et STEWARD (F.C.), 1959. — The growth promoting activity of Coconut milk. The nature of the active fraction. *Plant Physiol. Suppl.* **34**, VIII.
- SHRANK (A.R.), 1957. — Stimulation of *Avena* coleoptile growth by kinetin and some of its analogs. *Plant Physiol. Suppl.* **32**, XLIX.
- SILBERGER (J.-J.), 1953. — Correlation of indoleacetic acid induced changes in nucleic acids with growth in tobacco pith tissue cultured « in vitro ». Thèse, Wisconsin.
- SILBERGER (J.J.) et SKOOG (F.), 1953. — Change induced by indoleacetic acid in nucleic acid contents and growth of Tobacco pith tissue. *Science*, **118**, 443-444.
- SKOOG (F.), 1944. — Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Amer. Journ. Bot.*, **31**, 19-24.
- SKOOG (F.), 1950. — Chemical control of growth and organ formation in plant tissues. *Ann. Biol.*, **26**, 545-562.

- SKOOG (F.), 1954 a. — Chemical regulation of growth in plants. Dynamics of growth Processes. 148-182. Princeton Univ. Press.
- SKOOG (F.), 1954 b. — Substances involved in normal growth and differentiation of plants. Abnormal and pathological plant growth. Brookhaven Symp. Biol., n° 6, 1-21.
- SKOOG (F.), 1955 a. — Growth factors, polarity and morphogenesis. *Ann. Biol.*, **31**, 1-13.
- SKOOG (F.), 1955 b. — Initiation of cell division and organ formation in plant tissues. *Journ. Cell. Comp. Physiol.*, **46**, 365.
- SKOOG (F.) et MILLER (C.O.), 1957. — Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in « vitro ». *Symp. Soc. Exper. Biol.* n° 11. The biological action of Growth substances. 118-131.
- SKOOG (F.) et TSUI (C.), 1948. — Chemical control of growth and bud formation in Tobacco stem segments and callus cultured « in vitro ». *Amer. Journ. Bot.*, **35**, 782-787.
- SMILLIE (R.M.) et KROTKOV (G.), 1960. — The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. *Canad. Journ. Bot.*, **38**, 31-49.
- STERLING (C.), 1950. — Histogenesis on Tobacco stem segments cultured « in vitro ». *Amer. Journ. Bot.*, **37**, 467-470.
- STERLING (C.), 1951. — Origin of buds in Tobacco stem segments cultured « in vitro ». *Amer. Journ. Bot.*, **38**, 761-767.
- STEWARD (F.C.) et CAPLIN (S.M.), 1951. — A tissue culture from Potato tuber : the synergistic action of 2,4-D and of coconut milk. *Science*, **113**, 518-520.
- STEWARD (F.C.) et CAPLIN (S.M.), 1952. — Investigations on growth and metabolism of plant cells. IV. Evidence on the role of the coconut milk factor development. *Ann. Bot. N.S.*, **16**, 491-504.
- STEWARD (F.C.) et CAPLIN (S.M.), 1954 a. — The growth of Carrot tissue explants and its relation to the growth factors present in coconut milk. I. (A). The development of the quantitative method and the factors effecting the growth of Carrot tissue explants. *Ann. Biol.*, **30**, 385-394.
- STEWARD (F.C.) et CAPLIN (S.M.), 1954 b. — The growth of Carrot tissue explants and its relation to the growth factors in coconut milk I : (B) the role of the coconut milk growth factor on development and its relation to proliferated and tumorous growth. *Ann. Biol.*, **30**, 395-398.
- STEWARD (F.C.) et SHANTZ (E.M.), 1954. — The growth of Carrot tissue explants and its relation to the growth factors in coconut milk II. The growth promoting properties of coconut milk for plant tissue cultures. *Ann. Biol.* **30**, 399-415.
- STEWARD (F.C.) et SHANTZ (E.M.), 1955. — The chemical induction of growth in plant tissue cultures. The chemistry and mode of action of plant growth substances. *Proc. Symp. Wye College*, 165-186.
- STEWARD (F.C.) et SHANTZ (E.M.), 1958. — Biochemistry and morphogenesis : knowledge derived from plant tissue cultures. In IVth International congress of Biochemistry. Vol. VI. Biochemistry of Morphogenesis. Pergamon Press (1959).
- STEWARD (F.C.) et SHANTZ (E.M.), 1959. — The chemical regulation

- of growth (Some substances and extracts wich induce growth and morphogenesis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **10**, 379-404.
- STEWART (F.C.), CAPLIN (S.M.) et SHANTZ (E.M.), 1955. — Investigations on the growth and metabolism of plant cells. V : Tumorous growth in relation to growth factors of the type found in coconut. *Ann Bot. N.S.*, **19**, 29-47.
- STOWE (B.B.) et THIMANN (K.V.), 1953. — Indole pyruvic acid in Maize. *Nature*, **172**, 764.
- THIMANN (K.V.), 1960. — In « Fundamental Aspects of normal and Malignant growth », 748-822. Wiktor W. Nowinski ed., Elsevier.
- THIMANN (K.V.) et CHOUARD (P.), 1956. — Les facteurs de la croissance cellulaire végétale. Les auxines. in « Exposés actuels de Biologie cellulaire », 77-155. Masson éd., Paris.
- THOMPSON (J.F.) et STEWARD (F.C.), 1951. — Investigation on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. II. *Plant Physiol.*, **26**, 421-440.
- THOMPSON (J.F.), ZACHARIUS (R.M.) et STEWARD (F.C.), 1951. — « Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. The reactions of Nitrogen compounds with ninhydrine on paper : a quantitative procedure. *Plant Physiol.*, **26**, 375-397.
- WHITE (Ph. R.), 1934. — Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.*, **9**, 585-600.
- WHITE (Ph. R.), 1939. — Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Amer. Journ. Bot.*, **26**, 59-64.
- WICKSON (M.) et THIMANN (K.V.), 1958. — The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. *Physiol. Plant.*, **11**, 62-74.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
 PREMIÈRE PARTIE :	
CHAPITRE PREMIER. — HISTORIQUE	
1. <i>Extraits de graines.</i>	11
2. <i>Extraits de fruits</i>	13
3. <i>Extraits de tissus.</i>	13
 CHAPITRE II. — MATÉRIEL BIOLOGIQUE.	
1. <i>Choix du matériel.</i>	15
2. <i>Stérilisation du matériel végétal.</i>	16
3. <i>Prélèvement des tissus.</i>	16
— <i>tissus de Carotte.</i>	
— <i>tissus de Topinambour.</i>	
— <i>tissus de moelle de Tabac</i>	
<i>Préparation et conservation du lait de Maïs.</i>	18
 CHAPITRE III. — ACTION DU LAIT DE MAÏS SUR LES DIFFÉRENTS TISSUS VÉGÉTAUX UTILISÉS.	
1. <i>Action sur les tissus de Carotte.</i>	19
2. <i>Action sur les tissus de Topinambour.</i>	20
3. <i>Action sur les tissus de moelle de Tabac.</i>	22
 CHAPITRE IV. — PREMIERS ESSAIS DE FRACTIONNEMENT DU LAIT DE MAÏS.	
1. <i>Effet de la chaleur.</i>	25
2. <i>Effet de la dialyse.</i>	27
3. <i>Extraction à l'éther.</i>	28
 DEUXIÈME PARTIE.	
Fractionnement par résines synthétiques échangeurs d'ions.	
CHAPITRE PREMIER. — PREMIERS ESSAIS DE FRACTIONNEMENT DU LAIT DE MAÏS PAR ÉCHANGEURS D'IONS.	
1. <i>Précisions techniques.</i>	31
2. <i>Séparation et analyse d'une fraction cationique.</i>	32
3. <i>Essais d'activité de la fraction cationique.</i>	34
4. <i>Activité de la fraction cationique, comparée à celle d'un milieu synthétique d'acides aminés.</i>	35
 CHAPITRE II. — FRACTIONNEMENT DU LAIT DE MAÏS EN TROIS GROUPES DE SUBSTANCES ACTIVES PAR ÉCHANGEURS D'IONS SUCCESSIFS DOWEX 50.- DOWEX 2.	
1. <i>Technique</i>	38
2. <i>Essais biologiques des fractions obtenues.</i>	39
3. <i>Action des échangeurs forts sur des oses réducteurs ou non.</i>	44

CHAPITRE III. — FRACTIONNEMENT DU LAIT DE MAÏS EN TROIS GROUPES DE SUBSTANCES PAR ÉCHANGEURS MÉLANGÉS.

1. *Technique de séparation du lait de Maïs par échangeurs mélangés.* 47
 - a) *Préparation du lit d'échangeurs mélangés.*
 - b) *Traitement du lait de Maïs.*
2. *Elution des substances fixées par les échangeurs d'ions.* 48
 - a) *Elution globale.*
 - b) *Elution sélective.*
 - c) *Activités de croissance.*

CHAPITRE IV. — APERÇU DES TECHNIQUES UTILISÉES PAR DIFFÉRENTS AUTEURS AU COURS DE TENTATIVES DE FRACTIONNEMENT DE LAITS VÉGÉTAUX. COMPARAISON ET CRITIQUE.

1. *Tentatives de fractionnement du lait de Coco.*..... 56
 - A) *Séparation par solvants organiques.*
 - B) *Séparation par précipitation de « complexe métallique ».*
 - C) *Fractionnement par échangeurs d'ions.*
2. *Fractionnement d'Albumen laiteux de Marron d'Inde et de Maïs.* 58
 - a) *Séparation par solvants organiques.*
 - b) *Séparation par précipitation de « complexe métallique ».*
3. *Observations.*..... 59

TROISIÈME PARTIE.

Étude de la fraction neutre et de la fraction basique du lait de maïs.

CHAPITRE PREMIER. — ÉTUDE DE LA FRACTION NEUTRE.

1. *Dialyse contre H_2O .* 62
2. *Dialyse contre de l'éthanol à 50 %.* 63

CHAPITRE II. — FRACTIONNEMENT DE L'ÉLUAT CATIONIQUE DU LAIT DE MAÏS.

1. *Fractionnement des cations organiques du lait de Maïs par électrophorèse.* 64
2. *Fractionnement des cations organiques du lait de Maïs par échangeurs basiques forts, comparaison avec les fractions actives de l'électrophorèse.* 66

CHAPITRE III. — PURIFICATION DE LA FRACTION ACTIVE SÉPARÉE DE LA FRACTION CATIONIQUE DU LAIT DE MAÏS.

1. *Essai de purification par électrophorèse sur papier.*..... 68
2. *Essai de purification par électrophorèse sur amidon.*..... 70
3. *Résultats.* 73
4. *Comparaison avec la « kinétine ».* 76
5. *Comparaison avec les résultats de SHANTZ et STEWARD.*..... 82

DISCUSSION ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHES 84

CONCLUSIONS

- *Propriétés physiques et chimiques* 87
- *Propriétés physiologiques* 88

BIBLIOGRAPHIE. 91

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Substances de croissance et membrane végétale. Rôle de l'auxine :

- 1° sur la synthèse des constituants membranaires (particulièrement son rôle dans la méthylation) ;
- 2° sur les modifications des propriétés physiques des membranes.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 16 juin 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Université de Paris,

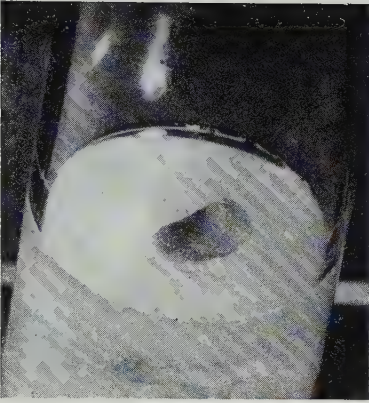
Jean SARRAILH.

EXPLICATION DE LA PLANCHE I

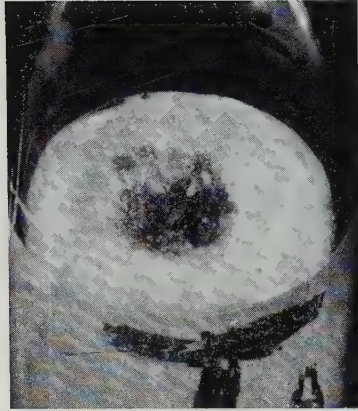
Cultures de tissus de moelle de Tabac sur différents milieux.

1. — Sur milieu de base (Knop) sans auxine.
2. — Sur milieu contenant 2 ppm d'auxine (AIA).
3. — Sur un milieu contenant 2 ppm d'auxine.
4. — Sur un milieu contenant 15 % de lait de Maïs.

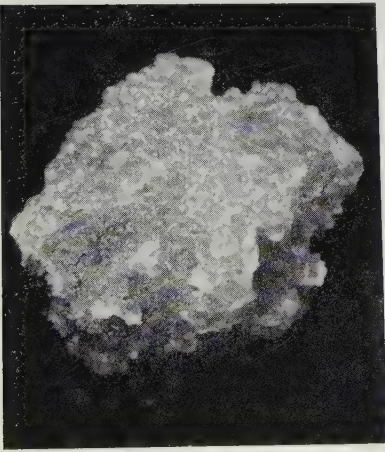
Planche I



1

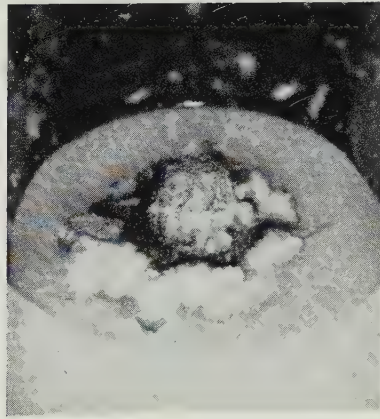


2



3

BEAUCHESNE phot.



4

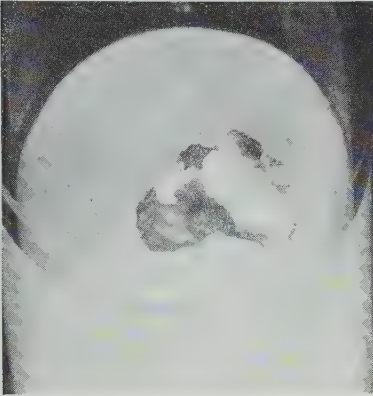
GRIMARD sc.

Cultures de tissus de moelle de Tabac sur différents milieux.

EXPLICATION DE LA PLANCHE II

Tissus de moelle de Tabac repiqués après un passage sur un milieu contenant 15 % de lait de Maïs.

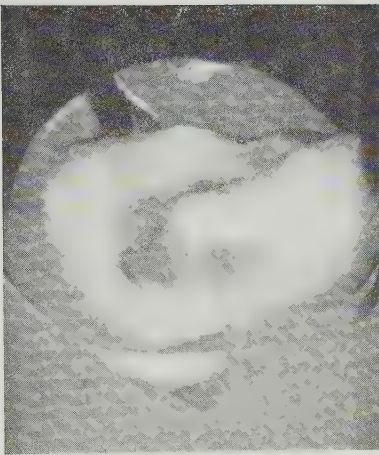
5. — Tissus repiqués sur un milieu sans auxine.
6. — Tissus repiqués sur un milieu contenant 2 ppm d'auxine.
7. — Tissus repiqués sur 15 % de lait de Maïs total.
8. — Tissus repiqués sur la fraction basique active.



5



6



7

BEAUCHESNE phot.



8

GRIMARD sc.

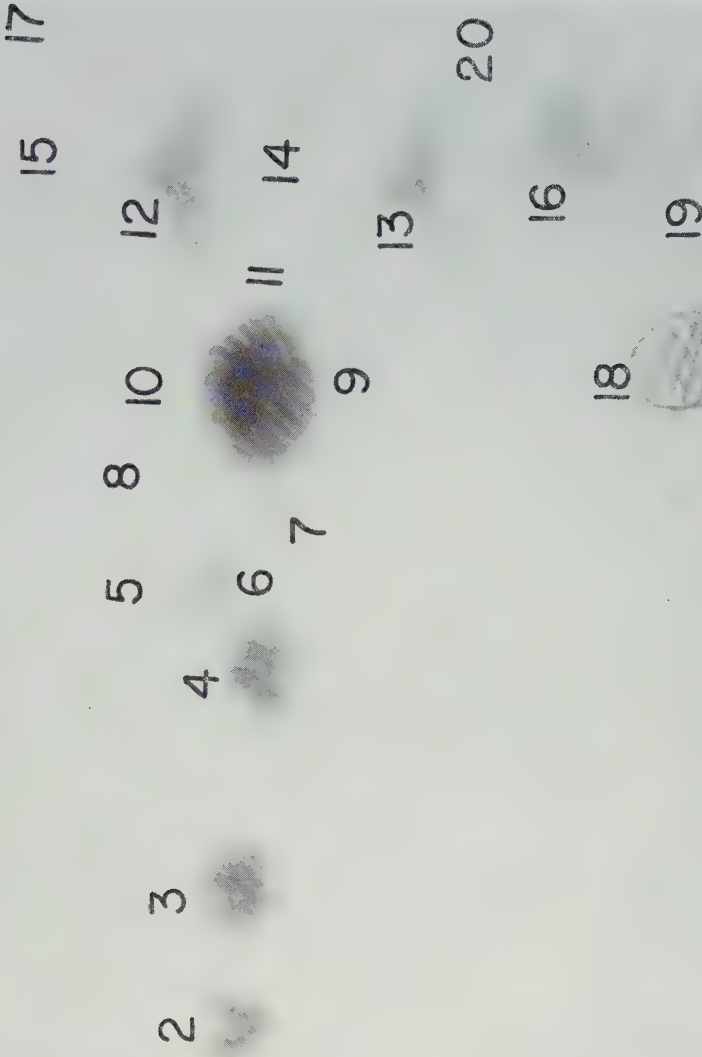
Tissus de moelle de Tabac repiqués après un passage sur un milieu contenant 15 % du lait de Maïs.

EXPLICATION DE LA PLANCHE III

Chromatographie des acides aminés du lait de Maïs (élual IR 120)

9. — 1. Cystéine (?) ; 2. Acide aspartique ; 3. Acide glutamique ; 4. Sérine ; 5. Asparagine ; 6. Glycine ; 7. Thréonine ; 8. Glutamine ; 9. α -alanine ; 10. β -alanine ; 11. Acide α -amino-butyrique ; 12. Acide γ -amino-butyrique ; 13. Valine ; 14. Proline ; 15. Arginine ; 16. Leucines ; 17. Lysine ; 18. Tryptophane ; 19 (?) ; 20. (?).

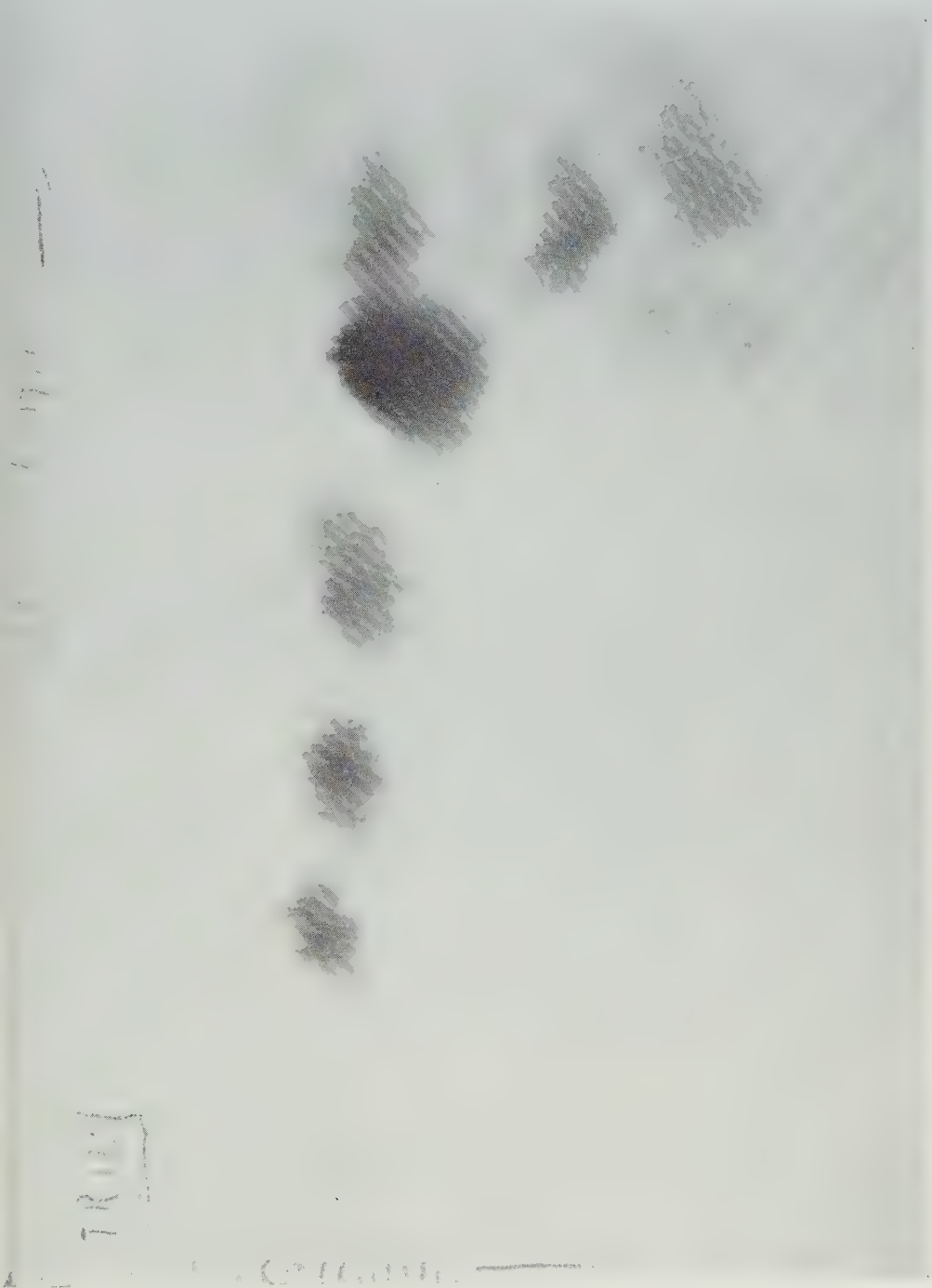
IR(120)



EXPLICATION DE LA PLANCHE IV

Chromatographie des acides aminés du lait de Maïs (éluat IR 120)

10 : chromatographie du même extrait mais beaucoup plus concentré.

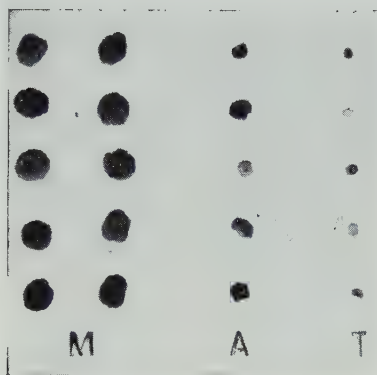


EXPLICATION DE LA PLANCHE V

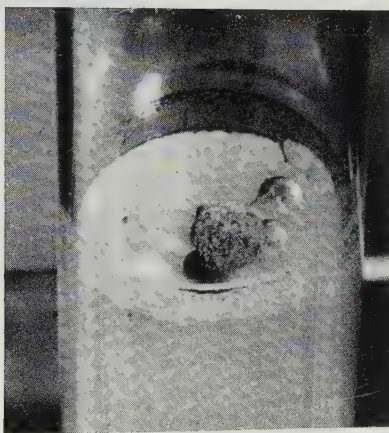
Action de la fraction cationique (éluat Dowex 50 ou IR 120)

11. — Action de la fraction cationique sur des tissus de Topinambour (Rouge de Gouvieux) : T : Témoin sans auxine ; A : Témoin avec auxine 0,5 ppm
M : Tissu s'étant développé sur la fraction cationique en présence d'auxine.

12. — Tissu de moelle de Tabac cultivé sur milieu contenant la fraction cationique en présence de 2 ppm d'auxine.



11



BEAUCHESNE phot.

GRIMARD sc.

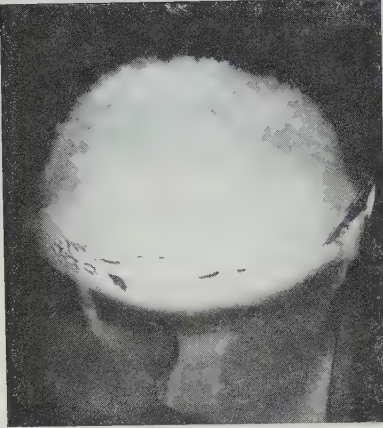
Action de la fraction cationique (éluat Dowex 50 ou IR 120).

EXPLICATION DE LA PLANCHE VI

Comparaison entre cultures de moelle de Tabac sur fraction neutre et fraction cationique.

- a) la fraction neutre non dialysée (13) et dialysée (14).
- et b) sur la fraction cationique purifiée par électrophorèse (15) et après traitement sur échangeur basique Dowex 2 (16).

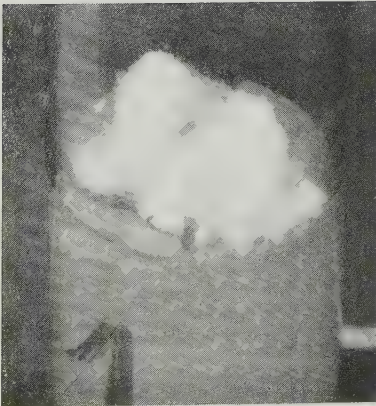
Planche VI



13

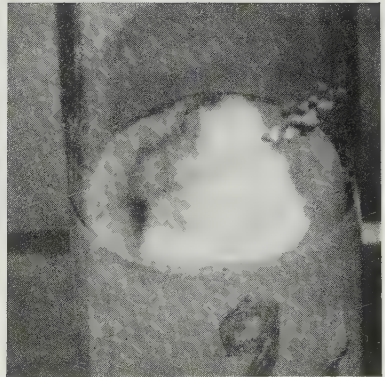


14



15

BEAUCHESNE phot.



16

GRIMARD sc.

Comparaison entre cultures de moelle de Tabac sur fraction neutre et fraction cationique.

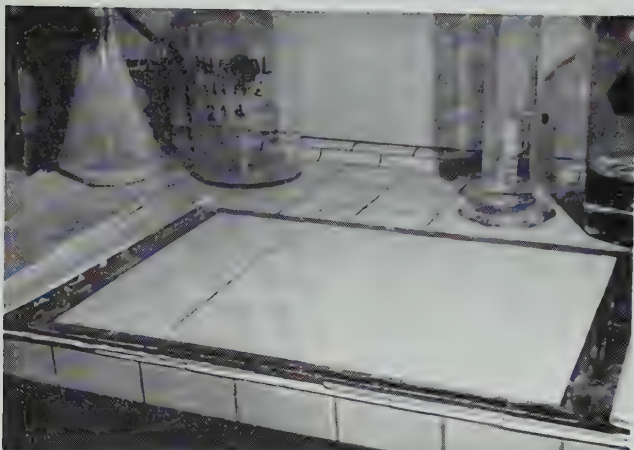
EXPLICATION DE LA PLANCHE VII

Appareil pour électrophorèse sur gâteau d'amidon

17. — Gâteau d'amidon préparé sur une plaque de chlorure de polyvinyl rigide.

18. — Le gâteau recouvert d'une autre plaque de chlorure de polyvinyl rigide, est serré entre trois mâchoires métalliques et disposé dans une enceinte de polystyrène expansé.

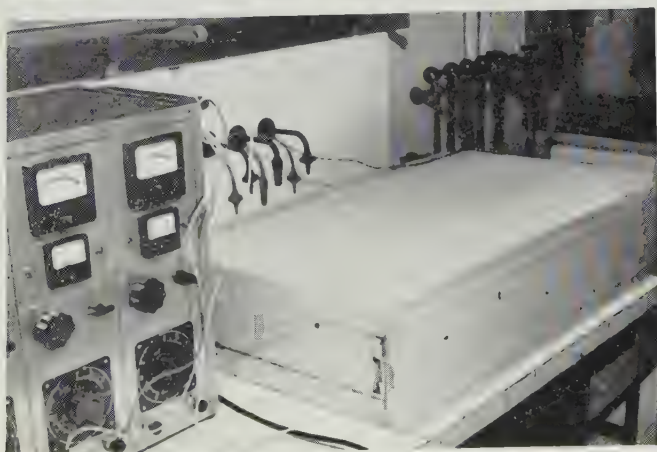
19. — Vue d'ensemble de l'appareillage en fonctionnement.



17



18



19

BEAUCHESNI phot.

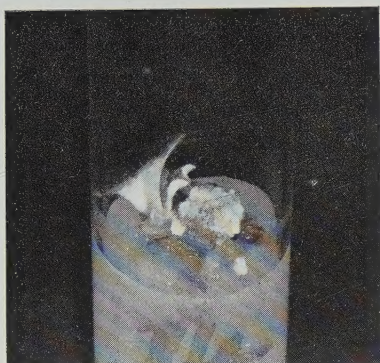
GRIMARD sc.

Appareil pour électrophorèse sur gâseau d'amidon

EXPLICATION DE LA PLANCHE VIII

Action de la purine active.

- a) sur moelle de Tabac en présence de 2 ppm d'AIA (20, 21, 23).
 - b) antagonisme entre AIA et « purine active » sur fragment de tige (22).
- TA : tige en présence de 2 ppm d'auxine ; M : tige sur fraction active sans auxine ; MA : tige sur fraction active + 2 ppm d'auxine.



20

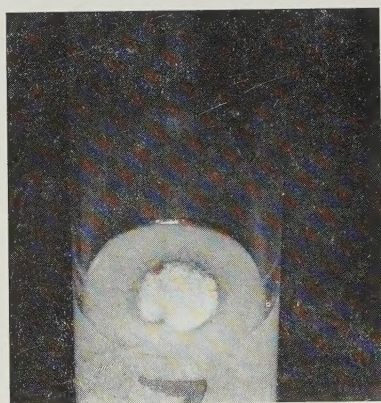


21



22

BEAUCHESNE phot.



23

GRIMARD sc.

Action de la purine active.

